

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Aislamiento y propagación de cianobacterias provenientes del lago  
de Atitlán

Trabajo de graduación presentado por Idida Jemima García Mendoza  
Para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería




Aislamiento y propagación de cianobacterias provenientes del lago  
de Atitlán

Trabajo de graduación presentado por Idida Jemima García Mendoza  
Para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

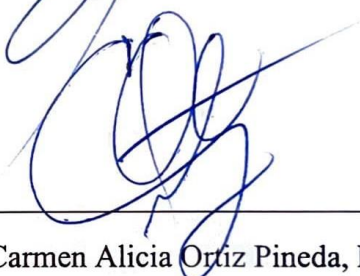
2024


Vo.Bo.:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Carlo Martínez

Tribunal examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, MM.Sc

(f)   
\_\_\_\_\_  
Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda, M.A

(f)   
\_\_\_\_\_  
Lic. Carlo Martínez

Fecha de aprobación: Guatemala 30 de abril de 2024

# Contenido

Prefacio .....	v
Lista de figuras .....	vi
Lista de cuadros .....	viii
Lista de cálculos .....	ix
Resumen .....	x
Abstract .....	xi
I. Introducción .....	1
II. Objetivos .....	3
III. Justificación .....	4
IV. Marco teórico .....	5
A. Cianobacterias .....	5
B. Aspectos taxonómicos e identificación de las cianobacterias .....	10
C. Condiciones de crecimiento .....	12
D. Cianobacterias en lago de Atitlán .....	15
E. Medio BG11 .....	18
F. Fotobiorreactores .....	18
G. Método de aislamiento celular .....	21
H. Método de fluorescencia para conteo celular de cianobacterias .....	23
I. Curvas de crecimiento bacteriano .....	23
J. Identificación bacteriana mediante la secuenciación de ARNr 16S .....	24
K. NCBI – Blast .....	25
V. Antecedentes .....	26
VI. Metodología .....	27
VII. Resultados .....	42
VIII. Análisis de resultados .....	53
IX. Conclusiones .....	58
X. Recomendaciones .....	59
XI. Referencias .....	60
XII. Anexos .....	64

## **Prefacio**

El tema del presente trabajo de graduación surge del interés por los microorganismos que por años han contaminado el lago de Atitlán, específicamente las cianobacterias, debido al gran potencial y adaptación de dichos microorganismos a grandes cambios en los sistemas acuáticos en donde suelen habitar. Por lo tanto, el aislamiento, la identificación y la propagación de cepas específicas de cianobacterias en la presente investigación, serán de beneficio para investigaciones sobre la contaminación del lago y el aprovechamiento de las cianobacterias para nuevos productos en beneficio de las comunidades aledañas.

Agradezco primeramente a Dios por la sabiduría y ser mi guía durante toda mi carrera universitaria, por bendecirme con una beca que me permitió estudiar en la Universidad del Valle de Guatemala y finalmente por culminar mi carrera con el presente trabajo de graduación. Agradezco a la Fundación Juan Bautista Gutiérrez por depositar su confianza en mí al hacerme acreedora de una beca universitaria y por el apoyo durante todo el proceso. Agradezco a mi asesor M.Sc. Carlo Martínez, por la confianza y consejos invaluable; al director de carrera M.Sc., Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano, por el apoyo y confianza durante todas las etapas; al MBA y M.Sc, Ing. Luis Núñez, por el apoyo y las enseñanzas en el inicio de este trabajo; a Verónica Jiménez y Melisa Paredes, secretarias del Departamento de Ingeniería Química, por el apoyo constante en la fase de experimentación; a los técnicos del Laboratorio de Operaciones Unitarias, Crithian, Héctor y José, por su disposición y apoyo permanente.

Agradezco a la Lcda. Mónica Martínez, investigadora de la Universidad del Valle de Guatemala, Campus Altiplano, al Centro de Estudios Atitlán y a AMSCLAE, por el apoyo durante la fase de campo de dicha experimentación, por facilitarme información y permitirme ser parte de la experiencia de monitorear el lago de Atitlán.

Agradezco a mi papá, Wingston García, a mi hermana, Debbie García, fueron clave para culminar mi carrera con sus sacrificios, amor, apoyo y motivación. Agradezco a mis primas, Angela y Cesia García, me brindaron apoyo emocional, amor y motivación durante cada etapa de mi carrera universitaria; a mis tíos, Miguel García y María Mendoza, que siempre estuvieron para mí con su amor y apoyo; y a mis demás familiares cercanos por su motivación y amor. Agradezco a mis amigos quienes me brindaron motivación y cariño en cada etapa de mi carrera universitaria.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Cadena fotosintética presente en las cianobacterias .....	6
<b>Figura 2.</b> Esquema de una célula vegetativa de Cianobacteria .....	9
<b>Figura 3.</b> Cianobacterias del orden Chroococcales .....	11
<b>Figura 4.</b> Cianobacterias del orden Oscillatoriales .....	11
<b>Figura 5.</b> Cianobacterias del orden Nostocales .....	12
<b>Figura 6.</b> Principales vías de asimilación de nitrógeno en la Cianobacteria .....	13
<b>Figura 7.</b> Imágenes microscópicas de agregados de Dolichospernum.....	16
<b>Figura 8.</b> Imágenes microscópicas de agregados de Limnoraphis.....	17
<b>Figura 9.</b> Imágenes microscópicas de agregados de Microcystis .....	18
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo de las diferentes configuraciones de fotobiorreactores .....	20
<b>Figura 11.</b> Aislamiento con pipeta Pasteur .....	21
<b>Figura 12.</b> Aislamiento por dilución seriada en tubos de ensayo.....	22
<b>Figura 13.</b> Fases de una curva de crecimiento bacteriano.....	24
<b>Figura 14.</b> Identificación de cepa de Microcystis en muestras de aguas recién obtenidas en agosto del lago de Atitlán con aumento de 40X.....	42
<b>Figura 15.</b> Identificación de cepa Limnoraphis en muestras de agua recién obtenidas en agosto en el lago de Atitlán, con aumento de 40X.....	43
<b>Figura 16.</b> Crecimiento de colonias de cianobacterias y microalgas, resultados iniciales de la siembra en placas de Petri de muestras obtenidas en enero y marzo con aumento de 10X .....	44
<b>Figura 17.</b> Crecimiento de colonias de Microcystis de la siembra en placas de Petri de muestras obtenidas en agosto .....	45
<b>Figura 18.</b> Microorganismos observados en las diluciones seriadas de las muestras de agua del lago de Atitlán en marzo, bajo microscopio .....	46
<b>Figura 19.</b> Colonias de la cepa Microcystis identificadas en las muestras procesadas en el laboratorio en agosto, con aumento de 40X.....	47
<b>Figura 20.</b> Aislamiento de colonias de Microcystis hacia tubos de ensayo de 5 mL con medio de cultivo BG11 formulado .....	48
<b>Figura 21.</b> Curva de crecimiento del cultivo de la cepa Microcystis en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL.....	49

<b>Figura 22.</b> Fases de la curva de crecimiento de la cepa <i>Microcystis</i> en fotobiorreactor de burbuja ascendente de 8,000 mL.....	50
<b>Figura 23.</b> Mediciones de pH del cultivo durante la fermentación de la cepa <i>Microcystis</i> en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL.....	51
<b>Figura 24.</b> Red de Nanoplancton con porosidad de 25um para recolección de muestras en el lago de Atitlán.....	67
<b>Figura 25.</b> Recolección de muestras de agua del lago de Atitlán en monitoreos en conjunto con el Centro de Estudios Atitlán (CEA) y AMSCLAE. Fecha: 17 de enero, Hora: 09:35 .....	68
<b>Figura 26.</b> Red de Nanoplancton con porosidad de 10 um para concentración de muestras del lago de Atitlán.....	68
<b>Figura 27.</b> Sistema de incubación para crecimiento con condiciones controladas (temperatura 22°C, fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad) con tira de luz roja led en el laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala.....	69
<b>Figura 28.</b> Sistema de incubación para crecimiento con condiciones controladas (temperatura 22° C, fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad) con luz roja tipo regleta, en el laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala.....	69
<b>Figura 29.</b> Propagación de la cepa <i>Microcystis</i> a diferentes escalas: 5, 50, 500 y 5,000 mL en medio de cultivo BG11 formulado y comercial.....	70
<b>Figura 30.</b> Crecimiento de la cepa <i>Microcystis</i> en medio de cultivo BG11 Broth comercial en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL en el laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala.....	70

## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Preparación de Stocks para formulación del Medio BG11.....	29
<b>Cuadro 2.</b> Cantidades de Stock para preparar 1L de medio de cultivo BG11 .....	29
<b>Cuadro 3.</b> Diluciones seriadas para aislamiento de Cianobacterias .....	32
<b>Cuadro 4.</b> Secuenciación del ADN de la cepa <i>Microcystis</i> de muestras de fotobiorreactores e inóculo inicial.....	52
<b>Cuadro 5.</b> Primera corrida de crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con medio de cultivo líquido BG11 Broth.....	64
<b>Cuadro 6.</b> Segunda corrida de crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con medio de cultivo líquido BG11 Broth.....	64
<b>Cuadro 7.</b> Promedio de las corridas de crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con medio de cultivo líquido BG11 Broth .....	65

## Lista de cálculos

<b>Cálculo 1.</b> Determinación de la masa de un reactivo para la preparación de una solución a una molaridad específica.....	66
<b>Cálculo 2.</b> Promedio de una serie de datos.....	66
<b>Cálculo 3.</b> Desviación estándar para una muestra.....	66
<b>Cálculo 4.</b> Tiempo de generación.....	67
<b>Cálculo 5.</b> Productividad.....	67

## Resumen

El presente trabajo se enfocó en el aislamiento, la propagación y la secuenciación de cianobacterias provenientes de muestras del lago de Atitlán, con lo cual se buscaba determinar las cepas presentes y su potencial aplicación en la industria. Se identificó la cepa *Microcystis*, perteneciente al orden *Chroococcales* de la familia *Microcystaceae*, en las muestras obtenidas en agosto, la cual fue posible aislar con el método con pipeta Pasteur, este método, es adecuado para separar fitopláctones mayores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, tales como *Microcystis* que presenta células esféricas envueltas en una capa mucilaginosa, con presencia de vesículas de gas que permiten su flotabilidad.

El aislamiento de la cepa *Microcystis*, permitió su propagación a diferentes escalas, con la cual se obtuvo un análisis de las fases de crecimiento del cultivo de la cianobacteria *Microcystis* en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL, se obtuvo una viabilidad promedio de  $98.87 \pm 0.005\%$  con una desviación estándar de  $0.83\% \pm 0.005\%$ , el tiempo de generación de 8.47 días y una productividad de  $7.03 * 10^6 \text{ células/L día}$ , evidencia un crecimiento lento y producción escasa de biomasa por una posible saturación de bicarbonato dentro del medio y aumento de pH por la presencia de microcistinas.

Se recomienda generar cultivos en medio líquido BG11 bajo sistemas de condiciones controladas, en cuestión de temperatura, luz y disponibilidad de nutrientes, asimismo, ampliar los estudios enfocados a variaciones del medio de cultivo, para ello se debe cambiar las concentraciones de sustratos y al aprovechamiento de microcistinas como aleloquímicos para aplicaciones industriales.

Palabras clave: cianobacterias, aislamiento, propagación, secuenciación, lago de Atitlán

## Abstract

The present work focused on the isolation, propagation and sequencing of cyanobacteria from water samples from lake Atitlán, with which we sought to determine the strains present and their potential application in the industry. In the water samples obtained in the month of August, the *Microcystis* strain was identified, belonging to the order *Chroococcales*, of the *Microcystaceae* family, which could be successfully isolated with the Pasteur pipette isolation method, being a successful method to separate phytoplankton from size greater than 10  $\mu\text{m}$  in diameter, such as *Microcystis*, which have spherical cells wrapped in a mucilaginous layer, with the presence of gas vesicles that allow their buoyancy.

The isolation of the *Microcystis* strain allowed its propagation at different scales, obtaining an analysis of the growth phases of the culture of the *Microcystis* cyanobacterium in 8,000 mL rising bubble photobioreactors with an effective reaction volume of 5,000 mL, obtaining an average viability of  $98.87 \pm 0.005\%$  with a standard deviation of  $0.83\% \pm 0.005\%$ , and the generation time of 8.47 days and a productivity of  $7.03 * 10^6$  cells/L day, evidencing slow growth and low biomass production due to a possible saturation of bicarbonate within the medium and an increase in pH due to the presence of microcystins.

Therefore, it is recommended to generate cultures in BG11 liquid medium under systems of controlled conditions, in terms of temperature, light and availability of nutrients. Likewise, expand studies focused on variations in the culture medium by changing substrate concentrations and the use of microcystins as allelochemicals for industrial applications.

Keywords: cyanobacteria, isolation, propagation, sequencing, lake Atitlán

## I. Introducción

El desarrollo de estudios relacionados al aislamiento de cepas específicas de cianobacterias provenientes de poblaciones naturales locales es de gran importancia para el progreso científico y tecnológico del país, ya que se encuentran adaptadas a las condiciones ambientales dominantes. Sin embargo, los estudios de especies presentes en los cuerpos de agua de Guatemala son escasos. Los cultivos de microorganismos como cianobacterias y microalgas han permitido ampliar el conocimiento sobre la complejidad de los ciclos de vida de diversas especies, esto genera información relevante sobre los diferentes estadios, toxicidad, requerimientos nutricionales, fisiología, información genética, biodiversidad, entre otros beneficios que establecen una referencia taxonómica para la detección de especies productoras de metabolitos tóxicos, estudio de pastoreo, función como indicadores de aguas, etc. Lo mencionado también se debe a que las cianobacterias cumplen un papel trascendente en las interacciones ecológicas que desarrollan, este tipo de relaciones simbióticas se dan con una variedad de organismos tales como hongos, briofitas, gimnospermas, angiospermas, animales marinos (esponjas y tunicados) e incluso una diversidad de bacterias. Sin embargo, su mayor importancia reside en el papel que desempeñan en el proceso fundamental de la fijación biológica de nitrógeno (Arredondo y Voltolina, 2010).

Las cianobacterias son organismos procariotas, los cuales pueden ser encontrados en forma unicelular estricta, agregados celulares o bien en filamentos. Dependen del proceso fotosintético para obtener energía. La facilidad de su crecimiento favorece su aparición en suelos y medios acuáticos, prefieren ambientes dulces, aguas alcalinas o neutras que mantengan un pH superior a 7.5, temperaturas por encima de los 25°C y altas concentraciones de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. En ambientes acuáticos durante años se ha presentado una creciente eutrofización, lo cual favorece la proliferación másica o floración, denominados *blooms*. Los *blooms* suelen detectarse a simple vista, cubren gran volumen del cuerpo acuático o se localizan a cierta profundidad donde forman estratos de muy poco espesor. Por lo general, los cuerpos acuáticos se ven afectados por los *blooms* de cianobacterias por la inhibición de la capacidad fotosintética de otras algas presentes, disminuyen la disponibilidad de oxígeno disuelto para la respiración, lo cual influye en la fauna del sistema en cuestión, por consiguiente, degrada la calidad del agua por la producción de olores y sabores desagradables. Sin embargo, el efecto más grave proviene de cepas capaces de producir toxinas las cuales producen síntomas agudos y crónicos posterior al contacto o ingestión. Es posible detectarlas por el cambio de pH producto de la incorporación de carbono inorgánico disuelto al realizarse la fotosíntesis lo que provoca un ambiente ligeramente alcalino (Llano, *et al*, 2005).

Para la obtención de cepas específicas de microorganismos como las cianobacterias, existen diversos procedimientos. Dichos métodos e instrumentos varían según el tipo de

microorganismo que se pretende aislar, la abundancia absoluta y relativa en el ambiente del cual se recolecta y la finalidad del aislamiento. Entre los métodos de aislamiento se encuentran el aislamiento con pipeta utilizado para cepas de interés con un tamaño mayor a 10  $\mu\text{m}$ ; este consiste en separar la célula con ayuda de un microscopio y una pipeta Pasteur de punta reducida para traspasarla a un medio estéril. Cuando el tamaño del microorganismo es menor a 10  $\mu\text{m}$  se utilizan las diluciones seriadas, este consiste en tomar de la muestra 1 mL y traspasarla a un tubo de ensayo con 9 mL de medio de cultivo estéril, y así sucesivamente hasta obtener el cultivo puro. Finalmente, el aislamiento se hace en placas de agar, el cual se emplea para purificar los cultivos, en donde se prepara el medio de cultivo con agar, posteriormente se inocula una a dos gotas de muestra y se esparce sobre toda la caja de Petri (Arredondo y Voltolina, 2010).

La identificación de una cepa presente en las muestras analizadas de cuerpos de agua de interés permitirá ampliar la gama de aplicaciones en la industria y la monitorización y evaluación de la calidad de agua, ya que es un paso esencial para determinar para qué es más adecuada en términos de la capacidad de producción de biomasa, productividad y perfiles metabólicos; y al realizar estudios específicos, se puede prevenir y controlar futuras floraciones en los cuerpos de agua. Por lo que las formas de realizar este procedimiento son por medio de identificación microscópica, con apoyo de literatura reportada por otros autores, se define la morfología y características generales de la cepa en cuestión para confirmar la especie y género; y secuenciación del ADN de la cepa estudiada, con lo cual se apoya el resultado de una identificación microscópica, para obtener resultados más ciertos y realizar estudios detallados sobre las diversas aplicaciones de esta.

Asimismo, dentro de las formas de estudio de las cepas aisladas se encuentra el crecimiento y escalamiento de estas, para lo cual es necesario conocer y analizar las curvas de crecimiento celular de las cianobacterias en condiciones de laboratorio, se deben emplear fotobiorreactores de columna ascendente. El proceso es posible al medir la concentración celular durante un período establecido de días, además, se debe monitorear las condiciones y recolectar los datos necesarios para explicar el comportamiento de la cepa estudiada y con ello brindar un estudio sobre su crecimiento donde se identifiquen las fases de la curva construida.

El presente trabajo tiene como objetivo el aislamiento, propagación y secuenciación del ADN de cianobacterias provenientes del Lago de Atitlán para determinar una cepa presente y con ello indagar sobre su potencial aplicación en la industria al tener cultivos puros de dicha cepa de interés y su estudio como posibles indicadores de la calidad de las aguas; asimismo, determinar la curva de crecimiento de la cepa de interés para observar las fases de crecimiento durante la fermentación y con ello enriquecer los estudios realizados dentro del Lago de Atitlán.

## **II. Objetivos**

### **A. Objetivo general**

Realizar aislamiento, propagación y secuenciación de cianobacterias provenientes del Lago Atitlán para determinar las cepas presentes y su potencial aplicación en la industria.

### **B. Objetivos específicos**

1. Realizar un aislamiento de las cepas presentes de cianobacterias en el Lago de Atitlán por medio de diferentes técnicas de microbiología para obtener un cultivo puro y su posterior propagación.
2. Realizar la identificación de una cepa presente de cianobacteria con base en la literatura reportada para realizar una comparación con la secuenciación de estas.
3. Propagar a diferentes escalas las cepas encontradas en medios de cultivo líquido para determinar su comportamiento de crecimiento.
4. Determinar las diferentes cepas presentes de cianobacterias en el Lago de Atitlán mediante la secuenciación de las muestras aisladas para su consideración como indicadoras de la calidad de las aguas.

### **III. Justificación**

En los últimos años, la contaminación por cianobacterias en el Lago de Atitlán ha incrementado, la *Dolichospermum*, *Limnoraphis* y *Microcystis* son las más abundantes según lo reportado en años anteriores, y aunque un reciente monitoreo no determinó un intenso florecimiento de cianobacteria para alarmarse, esto representa un problema para los pobladores y la fauna y flora del lugar. La problemática reside en que en un principio estos microorganismos solamente cubrieron un 30% de la superficie del Lago de Atitlán, pero conforme pasa el tiempo estos niveles aumentan, según lo reportado por Azurdía (2018), una cobertura del 70% del lago, el gran florecimiento de cianobacterias ha sido producto de una entrada incontrolable de nutrientes lo cual eleva los niveles de fósforo (Rejmánková et al, 2010) y permite un crecimiento acelerado de dichos microorganismos.

Las cianobacterias representan un componente común e importante del fitoplancton en cuerpos de agua, pero al encontrarse bajo condiciones específicas, se favorece la acumulación masiva de ciertos géneros, como *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* *Nostoc* y *Nodularia*, esto da lugar a lo que se conoce como florecimientos algales o “blooms”. Los blooms pueden aparecer rápidamente y sin advertencia. Su aparición está asociada también a condiciones de calma en el cuerpo de agua, lo que permite que los microorganismos floten a la superficie y esto ocurre solamente si existe una población de cianobacterias (Mora & Ruiz, 2012). Estos microorganismos pueden producir toxinas llamadas cianotoxinas, y al estar en concentraciones altas, podría representar un riesgo a la salud de la población que consume sus aguas (Maynés, 2010). Sin embargo, estos microorganismos juegan un papel fundamental en las redes tróficas y contribuyen en el ciclo de nutrientes por la capacidad de algunas especies de fijar nitrógeno. Es por ello por lo que tienen un gran potencial para ser empleadas para tratamiento de aguas residuales, biofertilización de suelos, bioindicadores de eutrofización y bioacumulación de sustancias recalcitrantes o tóxicas (Comba, 2009).

Por lo que es importante conocer el comportamiento de crecimiento de dichos microorganismos por medio de curvas de crecimiento, y realizar una identificación de grupos de cianobacterias con potencial para originar floraciones, para poder detectar las zonas más susceptibles de sufrir proliferaciones, ya que la detección de cambios a partir de la dinámica de las comunidades fitoplanctónicas resulta un dato confiable y de bajo costo, el cual se basa en que dichos microorganismos reflejan los cambios que se han presentado en un recurso hídrico por las interacciones y reacciones que se llevan a cabo, y esto permite una aproximación al estado trófico de un cuerpo de agua, encontrar las causas de tal estado y prevenir problemas futuros (Comba, 2009).

## IV. Marco teórico

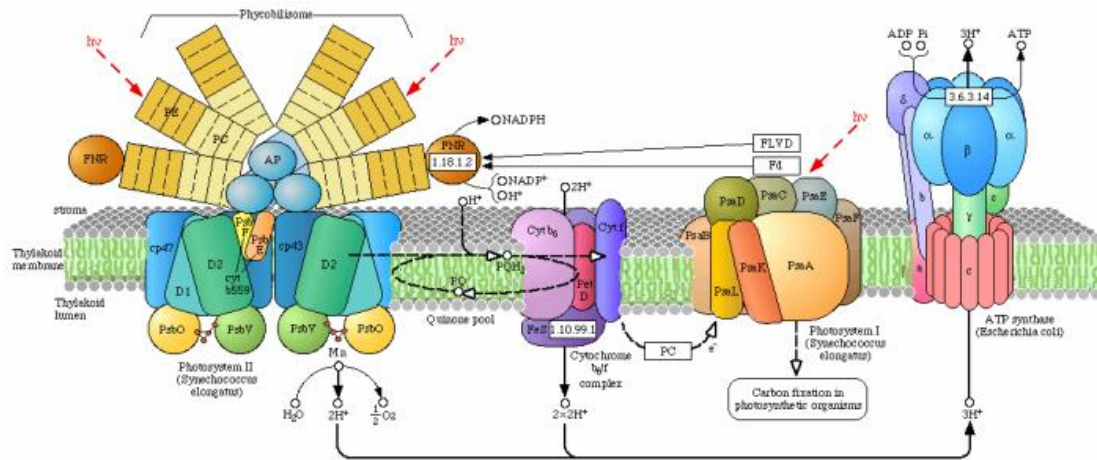
### A. Cianobacterias

Las cianobacterias son algas verde azules, organismos microscópicos, bacterias Gram negativas, las cuales comprenden un grupo grande y heterogéneo de procariontes fotoautotróficos oxigénicos; este grupo grande y diverso de bacterias que poseen clorofila sin poseer cloroplastos realiza la fotosíntesis cuando hay presencia de luz y aire, este es su principal modo de obtención de energía. Debido a su ancestral origen evolutivo, y al presentar características similares entre los grupos de procariontes y de algas eucariontes o de plantas, las cianobacterias representan uno de los grupos más controversiales en los ecosistemas acuáticos; se clasifican según dos sistemas taxonómicos distintos: la clasificación botánica y la nomenclatura microbiológica, en esto reside la diferencia con las microalgas, ya que estas últimas se clasifican como microorganismos eucariotas al poseer núcleos en sus células, y en el caso de las cianobacterias, son del tipo procariota, en donde sus células carecen de núcleo y su información genética se encuentra libre en el citoplasma celular (Cirés, *et al*, 2011).

Este tipo de microorganismos, denominados como procariontes fotosintéticos oxigénicos, presentan una característica principal que los define: la presencia de dos fotosistemas, el fotosistema I en donde se encuentra la clorofila *a* (principal colector de energía), carotenoides (cumplen con la función protectora contra la oxidación de pigmentos), y ficobiliproteínas, y el fotosistema II, al cual es cedido la mayor parte de la energía captada, en donde participan las ficobiliproteínas que forma parte del sistema antena en unos complejos multimoleculares llamados ficobilisomas; y el uso del agua como fotoreductor en el proceso de la fotosíntesis, todos los miembros conocidos son capaces de emplear el  $CO_2$  como la principal fuente de carbono celular (Chico, 2010).

Los principales componentes del aparato fotosintético se encuentran en los tilacoides, estos son: los pigmentos, centros de reacción y cadena de transporte (Figura1). Asimismo, las cianobacterias presentan gran importancia al ser colonizadoras de tierras áridas, tener capacidad de fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en condiciones aerobias, lo cual despierta el interés en desarrollo de estudios con fines agrícolas al ser empleadas como posibles biofertilizantes (Mora & Mora y Ruiz (2012).

**Figura 1.** Cadena fotosintética presente en las cianobacterias



*Nota.* Adaptado de Mora y Ruiz (2012).

Estos organismos se encuentran entre los más primitivos de la tierra, ya que su origen se estima en unos 3,500 millones de años. En un sentido general desde un punto de vista biotecnológico, podrían considerarse solamente como microalgas, ya que la definición de “microalga” es referida a microorganismos que contienen clorofila *a* y pigmentos fotosintéticos producto de la fotosíntesis oxigénica que realizan. Este término no tiene sentido taxonómico, por lo que denotan un grado ecológico estructural y no una entidad biosistemática, por lo que el término “alga” no tiene implicaciones filogenéticas e incluye dos tipos de organismos celulares: las cianobacterias, que presentan una estructura celular procarionta, y los organismos restantes, microalgas con estructura celular eucariota (Chico, 2010; Ajcalón *et al*, 2011).

Las cianobacterias son organismos muy importantes dentro de los ecosistemas acuáticos continentales, ya que forman, en conjunto con las microalgas, la base de las redes tróficas (Chico, 2012). Son capaces de formar relaciones simbióticas con una variedad de organismos, como hongos, algas verdes, diatomeas, musgos, angiospermas, protozoos, bacterias, etc. Por lo general, en estas asociaciones, la cianobacteria excreta amonio para el hospedador, con excepción para las asociaciones con hongos (líquenes) en donde se aporta glucosa. El hospedador se encarga de aportar sustrato donde se puede desarrollar y metabolitos necesarios para su crecimiento. Las cianobacterias del tipo simbióticas poseen una mayor actividad nitrogenasa y un mayor porcentaje de heterocistos en comparación con las de vida libre y bajos niveles de glutamina sintetasa, esta enzima es necesaria para incorporar amonio a los aminoácidos (Mora & Ruiz, 2012).

Debido a la contaminación antrópica y el aumento de temperatura global causado por el cambio climático, ha provocado problemas asociados a proliferaciones, como son el caso de los cambios en las propiedades organolépticas del agua, disminución de la diversidad biológica del ecosistema y posible producción de metabolitos tóxicos. Las cianobacterias suelen encontrarse en medios dulceacuícolas (lagos, ríos, arroyos, fuentes, entre otros) en

donde se ha observado que bajo ciertas condiciones nutricionales y algunas fisicoquímicas, aparecen florecimientos masivos de dicho microorganismo en la superficie, lo que contribuye a los problemas de contaminación en el cuerpo de agua. Las limitaciones de las cianobacterias es que no son capaces de crecer en condiciones de pH inferiores a 4, lo cual indica la preferencia por aguas neutras a alcalinas, donde crecen en temperaturas entre 15 a 30 °C y con una alta concentración de nutrientes, específicamente de nitrógeno y fósforo (Ajalón *et al*, 2011; Roset, *et al*, 2001; Ortez, *et al*, 2022; Mora & Ruiz, 2012).

Según Comba, N. 2009, las densidades permitidas para los sistemas artificiales y naturales de cuerpos de agua son menores a 20,000 células/mL ya que se producen niveles de cianotoxinas menores a 1 ppb. Dentro de la producción de metabolitos tóxicos por parte de las cianobacterias, se conocen tres tipos funcionales de cianotoxinas: hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas; las más estudiadas son el grupo de hepatotoxinas, específicamente las microcistinas. Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos con una cadena lateral de aminoácidos (ADDA: ácido 3 amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico), alcaloides y fosfatos orgánicos, que son secretados por una variedad de cianobacterias, y se relacionan con la mortandad en la fauna del cuerpo de agua, así como de enfermedades crónicas por su acumulación en el hígado al presentar un consumo masivo, incluso ha sido asociado con el mal sabor de algunas especies de peces locales.

Las microcistinas inhiben la actividad de la fosfatasa, debido a que tienen una toxicidad cien veces mayor a la del cianuro (Comba, 2009); son muy estables y resistentes a la hidrólisis química u oxidación a pH casi neutro, por lo que el medio en donde se encuentre por lo general presentará un rango de pH entre 7 a 8, es decir, neutro o ligeramente alcalino. Entre las especies productoras se encuentran: *Microcystis sp.*, *Nodularia sp.*, *Oscillatoria sp.* y *Phaktotrix sp.* (Moreno, 2002).

Por lo general, en los cuerpos de agua se encuentran condiciones favorables que permiten el desarrollo de las floraciones, por lo tanto, son las causas de crecimientos masivos. No es necesario que estén presentes todos los factores siguientes, sino que, depende de las características naturales de los cuerpos de agua. Solo son necesarios algunos, los cuales son procesos asociados a las actividades humanas (Mora & Ruiz, 2012):

- Introducción de nutrientes provenientes de aguas residuales domésticas o industriales que no están tratadas y son vertidas directa o indirectamente al cuerpo de agua.
- Aportes difusos provenientes de aguas de escorrentía producto de lavado de suelos en áreas cultivadas y fertilizadas, suelos deforestados o campos con ganadería.
- Carga excesiva de nutrientes, específicamente por nitrógeno y fósforo, lo cual transforma uno y otro componente en el nutriente limitante que permite que algunas especies sean capaces de desarrollar determinadas estrategias para superar la carencia y alcancen densidades altas.
- Incremento en las intensidades lumínicas propias de primavera y verano, que están asociados al incremento de temperaturas y duración del día solar. La luz, al tener incidencia directa sobre el metabolismo algal, genera un aumento en la actividad fotosintética y demanda de nutrientes, lo que incrementa la biomasa y

la tasa de multiplicación, que ocasiona el incremento de poblaciones de determinadas especies. Cuando se genera la alta intensidad lumínica, se puede producir fotoinhibición para algunas especies, o bien, generar la muerte y sedimentación de algas, que se acumulan en la superficie, dichos sedimentos incrementan la turbidez de la columna de agua y limita el crecimiento algal. Este suceso no afecta al crecimiento de las cianobacterias, ya que, en algunas especies, la presencia de vacuolas de gas regula su posición en la columna de agua, lo que permite que permanezcan en las capas superiores iluminadas y, por lo tanto, desarrollan floraciones.

- Aumento de la temperatura del agua sobre los 20°C lo cual favorece al desarrollo de las cianobacterias, incrementa la tasa de crecimiento y reproducción celular. Dicho aumento en la temperatura genera también una estratificación de la columna de agua, forma un gradiente vertical de densidad, y en ausencia de viento o baja turbulencia (velocidad de viento menor a 3 m/s), se acelera el proceso de sedimentación de las partículas, en donde se da un agotamiento de nutrientes y acumulación superficial de cianobacterias.
- Disminución de la concentración de carbono inorgánico disuelto, en donde se incrementa el pH, esto favorece el desarrollo de floraciones. El incremento de pH puede darse por características naturales del sistema, o bien, por efectos del crecimiento de fitoplancton. Por lo que la incorporación de carbono, que las algas suelen tomarlo como dióxido de carbono ( $CO_2$ ) disuelto en el agua mediante la fotosíntesis, genera un cambio en la concentración de iones por la disminución de carbono disponible, y esta situación genera el aumento de pH y la limitación para crecimiento de algunas especies de algas, exceptuando las cianobacterias.

Sin embargo, una amplia variedad de cianobacterias presenta diversas características que son de gran utilidad y beneficio, tales como un alto contenido de proteínas, ácidos grasos esenciales y vitaminas, dichas características se dan gracias a los polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados, terpenos, clorofila y pigmentos que se encuentran presentes en su composición (Romero *et al*, 2017). Cuando las cianobacterias realizan la fotosíntesis liberan oxígeno, incorporan carbono inorgánico disuelto, específicamente  $CO_2$  y  $HCO_3^-$ , lo que coincide con un aumento de pH, y presentan pigmentos de clorofila *a* y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares (Chico, 2010).

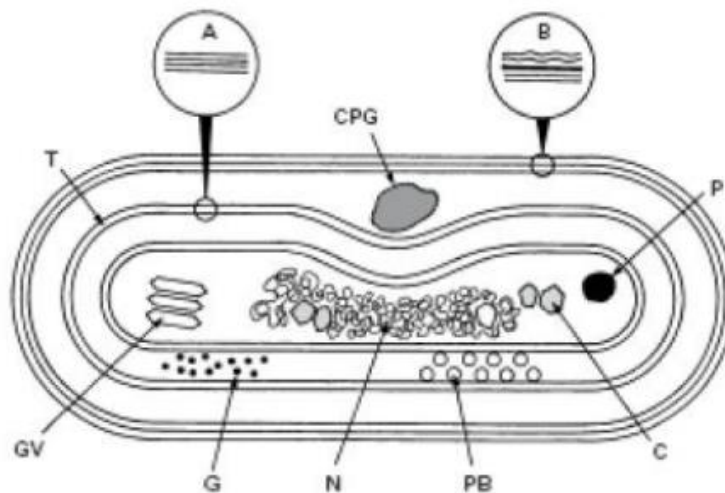
En general las cianobacterias son unicelulares, coloniales y algunas de forma filamentosa que se reproducen por fisión binaria, en formas unicelulares y pseudofilamentosas, cuando se da la reproducción es por medio de fisiones múltiples internas, con frecuencia es adicional a la fisión binaria en células vegetativas. El producto de las fisiones son las endosporas y, según la división celular, se observan poblaciones unicelulares, en caso sea en más planos y estas permanecen en unión dentro de una matriz; cuando la fisión ocurre en un solo plano y la separación es incompleta, se obtienen colonias de varias células, y se forman cadenas cortas o largas, llamados tricomonas. Cuando las tricomonas están incluidas en una matriz, se le conocen como filamentos, estos se presentan como uniseriados o multiseriados, en el segundo caso se observan ramificaciones falsas o verdaderas lo cual dependerá del origen de la ramificación (Chico, 2010).

Las cianobacterias presentan una pared celular del tipo Gram negativo, la capa de peptidoglicano suele ser más gruesa que la presente en proteobacterias Gram negativas, con un grosor entre 1 a 10 nm. Cianobacterias unicelulares, coloniales y filamentosas presentan una envoltura exterior de la membrana externa, la cual se le confiere el nombre de matriz, glicocálix o cápsula, o si depende de la consistencia como gel, mucílago o baba. Por lo que, según la composición de la cepa, esto puede variar en polisacáridos o polipéptidos (Chico, 2010).

En el exterior de las células de cianobacterias, aparecen fimbrias o pilis que les confieren motilidad natatoria en algunos tipos unicelulares pequeños, aunque no se ha demostrado presencia de flagelos procarióticos y organelos de propulsión, en cianobacterias con formas filamentosas se les observa una motilidad suave. En el interior, los tilacoides se presentan como invaginaciones de la membrana citoplasmática, con puntos de adhesión o centros tilacoidales, los cuales están asociados a la periferia del citoplasma o la membrana citoplasmática (Chico, 2010).

En la mayoría de las cianobacterias hay presencia de ficobilisomas hemisféricos o hemidiscoidales (complejos agregados de proteína y pigmentos), estos se relacionan en mayor parte a la captación de luz de la mayoría de las cianobacterias que permiten la producción de pigmentos tales como aloficocianina, clorofila *a*, ficocianina, ficoeritrocianina y ficoeritrina. Otros componentes que se observan dentro del citoplasma son gránulos de glicógeno, de cianoficina, carboxisomas, polifosfatos, vacuolas de gas, entre otros (Chico, 2010).

**Figura 2.** Esquema de una célula vegetativa de *Cianobacteria*



*Nota:* Detalle de tilacoide que muestra las membranas tilacoidales; B: Detalle de la envoltura celular que muestra la membrana externa, la capa de peptidoglucano y la membrana citoplasmática; C: Carboxisoma; CPG: gránulo de cianoficina; T: tilacoide; P: gránulo de polifosfato; N: región nucleoplásmica; G: gránulos de glucógeno; PB: ficobilisoma; GV: vesícula de gas; Adaptado de Mora y Ruiz (2012).

Las cianobacterias representan una gran importancia para diversos procesos en la naturaleza y proveen moléculas bioactivas, por lo que su potencial biotecnológico ha sido de gran interés para estudios por su capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados tipo EPA (*Eicosapentanoico*) y DHA (*Docohexanoico*), entre otros compuestos (Ramírez *et al*, 2013). En general, las microalgas representan una rica de productos químicos con diversas aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica, incluso, en la industria de combustibles. Por ello, las cianobacterias son consideradas como una fuente de metabolitos de gran importancia desde un punto industrial y biotecnológico. Algunos metabolitos secundarios exhiben efectos tóxicos en organismos vivos, donde las cianotoxinas son las que desempeñan papeles ecológicos tales como aleloquímicos que pueden emplearse en el desarrollo comercial de compuestos que funcionen como alguicidas, herbicidas e insecticidas en plantaciones, por ejemplo (Chico, 2010).

Según las características de la cepa de cianobacteria de estudio, se orienta la aplicación dentro de la industria para aprovechamiento de los metabolitos que se producen por su crecimiento. Tal es el caso para las cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, que tienen importancia para su empleo como biofertilizantes. En plantaciones de arroz en Asia, se mantiene la productividad sin uso de fertilizantes desde hace siglos, debido a la presencia de cianobacterias con heterocistos. Otro caso, es la fotoproducción de combustibles, tales como el hidrógeno ( $H_2$ ) y los compuestos químicos reducidos como el  $NADPH_2$  a partir de cianobacterias heterocistíneas, en donde se favorece la producción por la enzima nitrogenasa presente en los heterocistos que presenta actividad hidrogenasa, lo cual reduce el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ). Otras cepas que son usadas como alimento y suplemento dietario generan grandes cantidades de biomasa que se emplean para la alimentación de peces, crustáceos, aves de corral y ganado por la presencia de aminoácidos, vitaminas, enzimas y ácidos grasos poliinsaturados (Aguilera & Echenique, 2010).

## **B. Aspectos taxonómicos e identificación de las cianobacterias**

Las cianobacterias poseen flexibilidad fisiológica y morfológica, lo cual permite que sus poblaciones se establezcan, ofreciéndoles ventajas frente a otras poblaciones de fitoplancton. Asimismo, pueden regular su flotabilidad al presentar vesículas de gas que permiten que se coloquen en la columna de agua a las profundidades en donde tanto la disponibilidad de nutrientes como de luz son los adecuados. La mayoría de las células suelen presentarse en forma libre. Estas habitan por lo general en ambientes acuáticos de agua dulce y salada; otras en ecosistemas terrestres. En ambientes acuáticos, tienen la capacidad de colonizar la zona planctónica y bentónica. Son organismos unicelulares, sin embargo, pueden encontrarse en formas coloniales cubiertas por una capa mucilaginosa o formando filamentos; su tamaño puede variar entre 0.5 y 40  $\mu m$  (Crettaz, 2018).

Anteriormente, la clasificación taxonómica de cianobacterias se realizaba con base a características morfológicas, luego se realizaron con características fisiológicas, ecológicas y ultraestructurales. Según tradiciones botánicas, dichos microorganismos se distinguen por sus propiedades morfológicas, las cuales incluyen la formación de colonias, morfología celular y envolturas extracelulares, pigmentación, reproducción, y por sus propiedades fisiológicas y bioquímicas (en menor medida) (Mora & Ruiz, 2012). A nivel taxonómico

se encuentran 3 órdenes que abarcan la diversidad morfológica y fisiológica de la cianobacterias, los cuales se presentan a continuación:

Chroococcales: estas son formas unicelulares y coloniales envueltas en una capa mucilaginosa; presenta una reproducción por medio de fisión binaria o múltiple, beocitos o exosporas; la división celular se da en uno, dos, tres o más planos; ejemplo de ello son las cepas *Microcystis aeruginosa*, *Aphanocapsa delicatissima*, *Merismopedia tenuissima* (Crettaz, 2018).

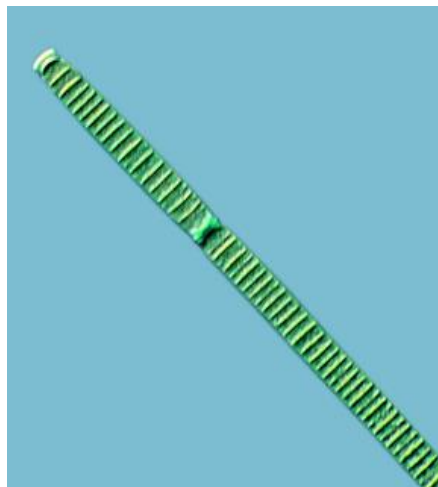
**Figura 3.** *Cianobacterias del orden Chroococcales*



*Nota.* Adaptado de Crettaz (2018).

Oscillatoriales: estas tienen la característica de ser filamentosas sin células diferenciadas, filamentos uniseriados y sin ramificaciones; su división celular se da en un plano perpendicular al eje del tricoma, y con o sin necridios; ejemplo de ello son las cepas *Planktothrix agardii*, *Pseudoanabaena mucicola*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Crettaz, 2018).

**Figura 4.** *Cianobacterias del orden Oscillatoriales*



*Nota.* Adaptado de Crettaz (2018).

Nostocales: estas suelen ser filamentosas, pero a diferencia con las del tipo Oscillatoriales, si presentan células diferenciadas, uniseriado o multiseriado. Dichas células diferenciadas incluyen los heterocistos, los cuales permiten la fijación de nitrógeno atmosférico y los acinetes que se encargan de la resistencia, las cuales se forman cuando las condiciones ambientales no son favorables. Su división celular se lleva a cabo en un plano perpendicular al eje del tricoma, su reproducción es por medio de hormogonios o hormocitos y tricomas isopolares o heteropolares, sin o con ramificaciones falsas o verdaderas; ejemplo de ello son las cepas *Dolichospermum planctonicum*, *D. spiroides*, *Nodularia spumigena* (Crettaz, 2018).

**Figura 5.** *Cianobacterias del orden Nostocales*



*Nota.* Adaptado de Crettaz (2018).

### **C. Condiciones de crecimiento**

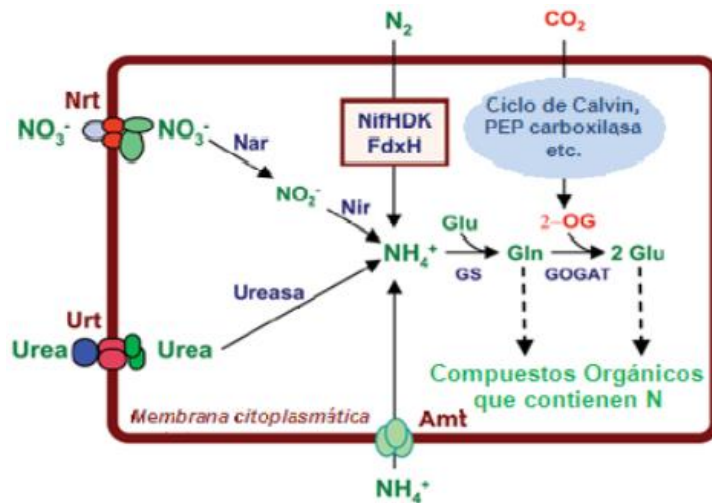
En general, las cianobacterias requieren de ciertas condiciones y parámetros para poder presentar un crecimiento masivo al momento de cultivarlas, algunos estudios presentan la relación de los parámetros entre sí, lo cual modifica la respuesta del metabolismo microalgal. Cuando las cianobacterias están presentes en sistemas naturales y tienen éxito en su crecimiento, indica una flexibilidad en los requerimientos e interacciones, lo cual es conveniente para sistemas de cultivo masivos de una especie de interés. Y según Chico (2010), un cultivo en crecimiento activo requiere de un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos abundante, condiciones adecuadas físico químicas como pH, temperatura, energía, luz, agitación, entre otras. Asimismo, las cianobacterias presentan una característica relevante y es la presencia de características morfológicas y fisiológicas capaces de responder a cambios extremos de la irradiancia, limitaciones de nutrientes, salinidad y pH. Y bajo el suministro de CO<sub>2</sub> en algunas cianobacterias, produce un incremento de biomasa y en los ambientes acuáticos depende de muchos parámetros que incluyen la lenta velocidad de difusión del CO<sub>2</sub> en el agua, pH, turbulencia y densidades celulares (Morales, *et al*, 2002).

Como bien se sabe, muchas cianobacterias fijan nitrógeno atmosférico, y algunas lo hacen en condiciones aerobias. Gracias a la nitrogenasa, el sistema enzimático complejo que se encarga de la fijación de nitrógeno es muy sensible al oxígeno, y en diversas cianobacterias hay separación espacial o temporalmente de los procesos fotosintéticos oxigénicos y la fijación de nitrógeno. En otros casos, las cianobacterias filamentosas confinan la nitrogenasa a los heterocistos, y en otros casos, hay expresión de la actividad de la nitrogenasa en periodos de oscuridad, específicamente en los ciclos de crecimiento luz-oscuridad (Chico, 2010).

En los ambientes naturales, la fuente más abundante de nitrógeno es el nitrato, y muchas cianobacterias estudiadas pueden utilizar esta fuente. La utilización de nitrato requiere de una reducción intracelular con el nitrato reductasa (NR) y el nitrito reductasa (NiR) justo después de la absorción de dicha fuente, para producir amonio, lo cual entra en el ciclo glutamina sintetasa-glutamato sintasa. La utilización del nitrito como fuente procede de una forma similar, pero en este caso no se requiere de nitrato reductasa, asimismo, en condiciones de crecimiento fotoautótrofo, la reducción de nitrato y nitrito está relacionada a la evolución fotosintética del oxígeno *in vivo* y de este modo se considera como un proceso fotosintético genuino (Chico, 2010).

En la figura 6, se puede observar que las fuentes de nitrógeno combinado son captadas por medio de las permeasas y metabolizados hasta amonio, lo cual se incorpora a esqueletos de carbono por medio de la glutamina sintetasa vía glutamato sintasa.

**Figura 6.** Principales vías de asimilación de nitrógeno en la Cianobacteria



Nota. Adaptado de Chico (2010).

En este caso el nitrógeno es distribuido de la glutamina o el glutamato, hacia otros compuestos orgánicos que presentan nitrógeno. La reacción de la ureasa se encarga de liberar dos moléculas de amonio y una de dióxido de carbono por cada molécula de urea degradada, y la nitrogenasa (NifHDK) y la ferredoxina específica de heterocistos (FdxH) se encuentran encerradas por un recuerdo para indicar que en algunas cianobacterias filamentosas la fijación de nitrógeno se da en los heterocistos (Chico, 2010).

Los factores que favorecen el crecimiento de las cianobacterias en donde se permite la optimización del empleo de los recursos y la minimización de pérdidas en la biomasa, son específicamente la luz y los nutrientes. Sin embargo, las interacciones tróficas entre organismos en el sistema acuático también determinan la dominancia o no de las cianobacterias, las cuales, también interactúan con otros productores primarios como algas del fitoplancton y plantas sumergidas, con las cuales comparten los mismos recursos (Mora & Ruiz, 2012).

Disponibilidad de luz: las cianobacterias son organismos que pueden crecer en condiciones no óptimas para el fitoplancton en general, debido a su fácil adaptación a intensidades de luz bajas o muy altas. El color característico verde-azul de las cianobacterias se debe a la presencia de pigmentos accesorio como son las ficobilinas, y la producción de estos se altera para aumentar la absorción de la luz en el espectro visible (400 a 700 nm). Dicha característica les provee una diferencia fundamental con las algas eucariotas, ya que las algas eucariotas del fitoplancton no pueden absorber luz a estos rangos de longitud de onda. Por lo que esta estructura pigmentaria les permite tener una alta tolerancia a condiciones de penumbra. Sin embargo, se tiene el otro extremo en donde algunas especies de cianobacterias son capaces de tolerar radiación solar directa, y pueden crecer y acumularse cercano a la superficie del cuerpo de agua (Mora & Ruiz, 2012).

Asimismo, se ha demostrado que las cianobacterias absorben mejor la luz roja, ya que favorece el crecimiento de la biomasa, ya que a longitudes de ondas rojas y azules promueven la concentración y producción de ficobiliproteínas, que son los pigmentos captadores de luz en el rango de longitudes de onda de 450 a 650 nm, estas se localizan en las membranas tilacoides y representan hasta el 50% del total de las proteínas celulares en las cianobacterias (Vega & Rivera, 2022).

Temperatura: las cianobacterias presentan una alta tasa máxima de crecimiento entre un rango de 22 a 30°C, si se alcanza una temperatura superior, ocurre una disminución abrupta de la tasa de crecimiento. Por lo general los rangos óptimos de temperatura para las cianobacterias no termofílicas suelen ser similares a los rangos de las algas eucariotas, pero existen cianobacterias que son dominantes en numerosos ecosistemas acuáticos polares, ya que toleran rangos amplios de temperatura (Mora & Ruiz, 2012).

Nutrientes: en el caso del proteoplasma celular de las algas eucariotas y cianobacterias, se requieren de 20 elementos químicos para la formación de nueva biomasa, algunos son necesarios en grandes cantidades (hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno) y otros en cantidades pequeñas (fósforo, azufre, potasio, sodio, calcio, magnesio, cloro). Los nutrientes que limitan el crecimiento del fitoplancton por lo general es el nitrógeno, fósforo, hierro o algún elemento traza (silicio, hierro, magnesio, molibdeno, cobre, cobalto, zinc, etc.). Cuando existe una alta tasa fotosintética, puede ocurrir una disminución en la concentración de dióxido de carbono, con lo cual ocurre un aumento de pH debido a la disminución de ácido carbónico disuelto. Dicho aumento de pH hace que la forma más abundante de carbono inorgánico sea bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), esto podría permitir la limitación del crecimiento de cianobacterias, pero estas al contener la enzima anhidrasa carbónica, pueden recurrir al bicarbonato como fuente alternativa de carbono inorgánico (Mora & Ruiz, 2012).

## D. Cianobacterias en lago de Atitlán

El Lago de Atitlán es el lago más profundo de Centro América, se ubica en una caldera volcánica llamada “Los Chocoyos”, la cual se formó por una erupción volcánica hace aproximadamente 84,000 años. En los márgenes se pueden encontrar los volcanes de Atitlán, Tolimán y San Pedro. Dicho lago se encuentra situado a 5,000 pies de altura y tiene 18 km de longitud. Su nivel de agua tiene una fluctuación natural a causa de los cambios al azar del drenaje subterráneo, dichos cambios se ven influenciados por movimientos sísmicos y rápidos incrementos del volumen de agua por tormentas de lluvia. Tiene una profundidad que alcanza los 342 m, su profundidad promedio es de 22 m, con un área superficial que fluctúa entre 125 y 130  $km^2$ , y su volumen de agua se encuentra entre 24 y 25  $km^3$  (Mora & Ruiz, 2012).

El territorio de la cuenca presenta una alta vulnerabilidad socioambiental ya que posee una densidad demográfica de 340 habitantes por  $km^2$ , los 15 municipios de la Cuenca del Lago de Atitlán y su entorno generan 150 toneladas métricas de desechos sólidos al día (Mora & Ruiz, 2012). Los principales problemas de contaminación de aguas son los siguientes:

- Contaminación química producto de fertilizantes agrícolas, plaguicidas, jabones, detergentes, tintas para textiles, aceites, lubricantes y combustibles.
- Contaminación biológica producto de desechos humanos y de animales domésticos, aguas mieles del beneficiado del café, desechos de rastros, desechos clínicos-hospitalarios, desechos de proyectos de acuicultura, plantas de tratamiento, fugas de fosas sépticas, entre otros más.
- Contaminación física producto de desechos sólidos y ripio.

(Mora & Ruiz, 2012)

En el Lago de Atitlán se han reportado gran cantidad de florecimientos de cianobacterias lo cual es causado por el uso inadecuado de fertilizantes químicos, descarga de aguas negras provenientes de comunidades aledañas, entre otras causas. Dentro de la salud pública y estudios ecológicos realizados en la zona, las cianobacterias representan un rol importante ya que son bioindicadores en saneamiento ambiental, en especial sobre la calidad del agua para uso humano (Ajcalón *et al*, 2011).

En 2009, los expertos confirmaron la presencia de cianobacteria en el Lago de Atitlán, las cianobacterias están presentes en estado dormido, pero ante un aumento de temperatura debido al aire caliente producto de El Niño, el florecimiento se tornó visible (Mora & Ruiz, 2012). Y conforme han pasado los años, el lago sigue en creciente contaminación según estudios reportados por el laboratorio del Centro de Estudios Atitlán de la Universidad del Valle, los cuales se encargan de investigar el lago y formas de preservarlo; las cepas tóxicas de la bacteria están relacionadas con afecciones al hígado, riñones, sistema nervioso central y dermis de humanos y animales, incluso ha sido vinculada con enfermedades cerebrales degenerativas. Uno de los recientes florecimientos reportados fue en 2015, por la Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca del Lago de Atitlán y su Entorno (AMSCLAE) (Baján, 2016).

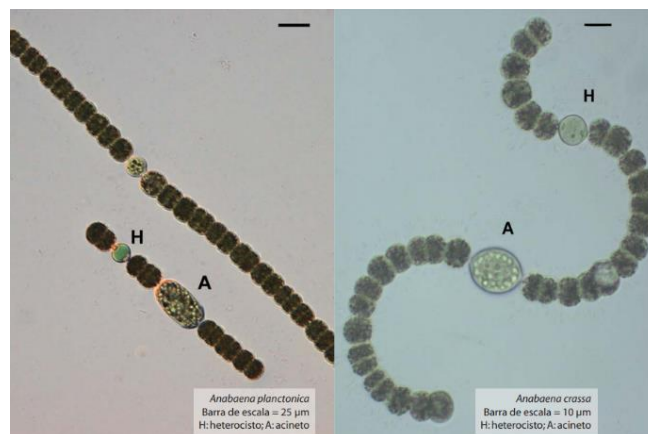
Asimismo, las cianobacterias presentes en el Lago de Atitlán aparecen naturalmente y no todas son tóxicas, estas presentan fósforo lo cual indica la contaminación por aguas residuales y fertilizantes usados para la agricultura en las comunidades aledañas a la cuenca del lago (Baján, 2016). Sin embargo, para el 2018, se registró un brote de cianobacteria en el lago calificado como no alarmante, el reporte indica un incremento en las especies de *Dolichospermum*, *Limnoraphis* y *Microcystis* (Pérez, 2018). Esto ha disminuido la transparencia del agua del lago con cambio de color de sus aguas debido al incremento de la cantidad de nutrientes que contiene fósforo y nitrógeno, los cuales son la fuente de alimento de las cianobacterias que aumentan su concentración, según AMSCLAE.

La aparición de la cianobacteria en el lago de Atitlán fue documentada desde 1976, sin embargo, el incremento de la concentración se debe a tres causas principalmente: la introducción de la lobina negra, pez depredador agresivo introducido en 1958, lo cual generó una pérdida de la cadena alimenticia ya que desplazó especies endémicas que contribuyen a mantener el equilibrio ecológico; exceso de nutrientes por aguas residuales, uso inadecuado de agroquímicos, jabones contaminantes y basura en el lago; y el aumento de temperatura, por arriba del rango de 23°C a 25°C, debido al cambio climático. Monitoreos recientes han revelado que el lago de Atitlán presente un 2% de oxígeno, donde lo normal y sano en un manto de agua es un 8% de oxígeno, lo cual se debe a que la cianobacteria está extendida por todo el lago (Mora & Ruiz, 2012).

## Dolichospermum

Comúnmente conocida como *Anabaena*, *Dolichospermum* pertenece a un género que comprende tanto especies bentónicas como planctónicas, esta cepa se presenta como filamentos solitarios, y en algunas ocasiones se forman agregados. Presentan formas rectas, curvadas o enrolladas regulares o irregulares. Sus tricomonas no se encuentran envueltas por vainas, y en algunas especies aparece un mucílago fino (Cirés & Quesada, 2011). Dicha cepa pertenece a la especie planctónica y suelen formar floraciones bastante evidentes como manchas de pintura y espumas. Las toxinas producidas por el género *Dolichospermum* son péptidos (microcystinas) y alcaloides (Aguilera & Echenique, 2010).

**Figura 7.** Imágenes microscópicas de agregados de *Dolichospermum*

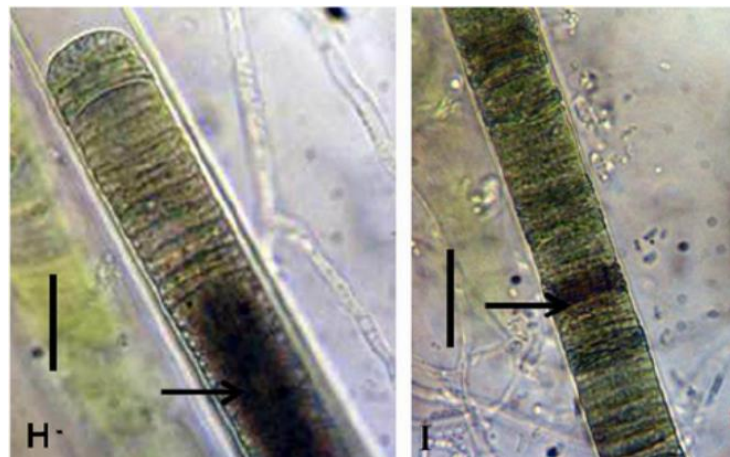


Nota. Adaptado de Cirés y Quesada (2018)

## Limnoraphis

*Limnoraphis* presenta una coloración pardo-rojiza o verdi-azul en su interior celular debido a que los carotenoides presentes cubren a los demás pigmentos. Dicha cepa se presenta como filamentos solitarios o en estratos, con una ecología denominada como plancton de grandes acuatorios oligomesotróficos. Las tricomonas se encuentran levemente constrictos o nulos (Comas *et al*, 2017). Las células son isodiamétricas y más largas que anchas, sin contricciones o ligeramente constreñidas en las separaciones entre células, y sus células terminales suelen ser cilíndricas y no presentan caliptra. La característica más representativa es la organización de las vesículas de gas, las cuales se ubican en los extremos de las células o unidas en un gran aerotopo en la parte central (Cirés & Quesada, 2011).

**Figura 8.** Imágenes microscópicas de agregados de *Limnoraphis*



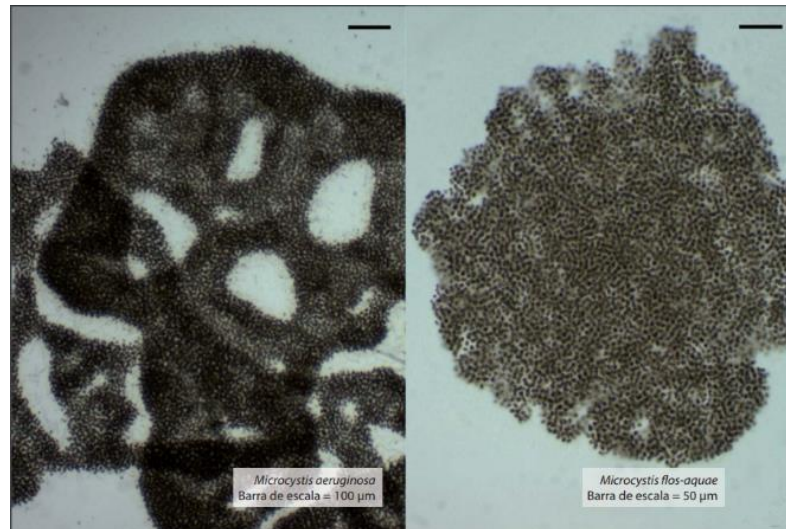
*Nota.* Adaptado de Comas et al. (2017).

## Mycrocystis

*Microcystis* es una de las especies de cianobacterias que se encuentran con mayor frecuencia en cuerpos de agua. Es una cepa tóxica al producir microcistinas, las cuales, al unirse a las fosfatasa, provocan la lisis de los hepatocitos. Además, es una especie formadora de floraciones superficiales acumulativas y presentan un mucílago y aerótopos que les proporciona la capacidad de regular su flotabilidad y su posición en la columna de agua. Se ven favorecidas a altas temperaturas, donde tienen un óptimo crecimiento entre 20 y 27 °C, alta disponibilidad de nitrógeno en forma de amonio y altas concentraciones de fósforo. Presenta una amplia tolerancia a intensidades de irradiancia incidente, ya que tiene la capacidad de regular su posición en la columna de agua y la presencia de pigmentos accesorio le brinda protección de la radiación ultravioleta (Gabito, 2019).

Además, *Microcystis* presenta colonias microscópicas o, en ocasiones, macroscópicas, suelen flotar; tienen una morfología esférica a irregulares y se presentan en subcolonias o colonias con células densamente agregadas, rodeadas por un mucílago común, fino u homogéneo (Cirés y Quesada, 2011).

**Figura 9.** Imágenes microscópicas de agregados de *Microcystis*



*Nota.* Adaptado de Cirés y Quesada (2018).

## E. Medio BG11

El medio de cultivo BG11 es un medio selectivo que contiene sales para el cultivo de algas de agua dulce, por lo que es exclusivo para cianobacterias que tienen la capacidad de fijar nitrógeno, ya que carece de nitrógeno. Dicho medio no permite el crecimiento de microorganismos dependientes de otras fuentes de nitrógeno, por lo que las cianobacterias, primero, realizan la fijación de nitrógeno, luego, lo emplean para las actividades metabólicas (Ortega *et al*, 2023).

## F. Fotobiorreactores

Es importante tomar en cuenta que existe un problema frecuente en el diseño de fotobiorreactores, es la provisión óptima de energía solar al aire libre, en donde todas las células deben tener la misma exposición de luz, lo cual suministra una relación área superficial/volumen grande, lo que permite una rápida transferencia de masa y una mayor productividad. El cultivo de cianobacterias para obtención de subproductos, como combustibles y pigmentos, acrecientan la necesidad de obtener un mayor rendimiento y reducir los costes del cultivo masivo, por lo que los fotobiorreactores cerrados son sistemas aislados que permiten un control sobre el medio, lo que los hace más precisos. Se han diseñado diferentes fotobiorreactores con propiedades específicas, las cuales pueden agruparse en tres tipos básicos: tubulares, de superficie plana y de tanque agitado (Ramírez *et al*, 2013).

**Fotobiorreactores tubulares.** Son los más implementados alrededor del mundo debido a su fácil operación, ya que facilita el escalamiento lo que incrementa la longitud, el número de tubos y une las múltiples unidades por medio de colectores; y estos presentan diferentes configuraciones (Ramírez *et al*, 2013):

Tubulares verticales o de columnas: estos están contruidos con tubos verticales transparentes de vidrio o polietileno, con el motivo de aprovechar la luz natural que penetra la superficie. Poseen un rociador que se ubica en el fondo del vaso, de modo que esparce pequeñas burbujas para homogenizar la solución, lo que permite una buena mezcla, suministro suficiente de  $CO_2$  y remoción de oxígeno (Ramírez et al, 2013).

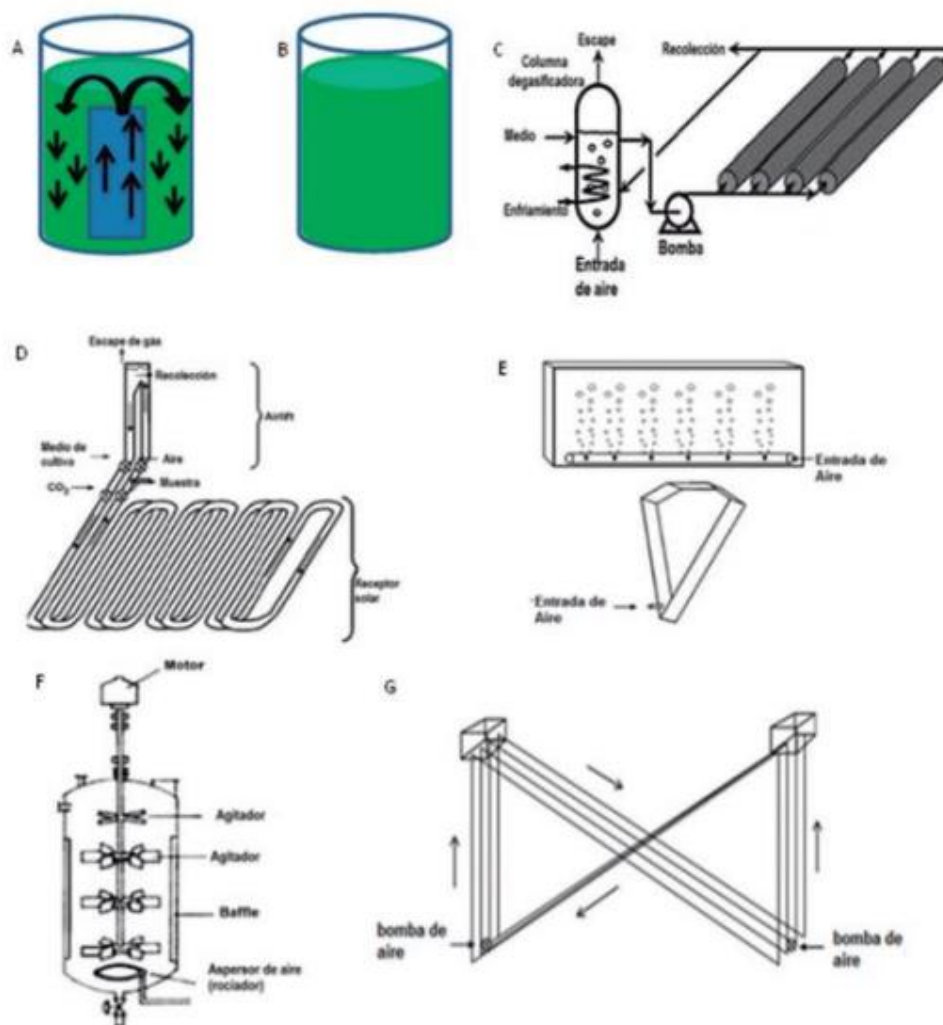
Tubulares horizontales: en este tipo de configuración se presentan diversos diseños, y su forma ofrece grandes ventajas en relación con sistemas abiertos, ya que la orientación hacia el sol brinda una alta y eficiente conversión de luz. La transferencia de gas se lleva a cabo por medio de las conexiones existentes en los tubos o en la unidad especial de intercambio de gas. Asimismo, dentro de las ventajas que presenta es el manejo de volúmenes grandes al ser menos susceptibles a la contaminación, sin embargo, entre las desventajas esta la generación de cantidades considerables de calor. Para la mejora se han adaptado métodos de enfriamiento, como es el rociar agua, solapamiento de tubos, sumergir el sistema en piscinas con agua a temperaturas controladas y regular la temperatura de alimentación en la recirculación (Ramírez et al, 2013).

Tubulares helicoidales: estos suelen estar compuestos por sets de tubos de polietileno, dispuestos en un armazón circular abierto, de modo que queden enrollados, acoplado a una torre de intercambio de gases y a un intercambiador de calor. Para hacer llegar el medio de cultivo hasta la torre de intercambio de gases se hace uso de una bomba centrífuga. En estudios anteriores se han realizado escalamientos, en donde se agregaron más unidades paralelas de capas de tubos, de modo que se mantiene la carga hidráulica sin cambio. Para aumentar la velocidad de mezcla y una entrada baja de energía, emplearon un procedimiento de entrada de gas pulsada, emplearon una fuente de luz interna, lo que permite un control razonable de la intensidad de luz y trayectoria de luz corta, a la vez mantiene la temperatura correcta (Ramírez et al, 2013).

**Fotobiorreactores de superficie plana.** Este tipo de fotobiorreactores presentan un diseño versátil para el uso eficiente de luz solar, puesto que pueden ser organizados de modo que estén orientados hacia el sol, esto permite una mejor eficiencia respecto a la energía absorbida. El material en que suelen ser elaborados tiende a ser transparente, como vidrio, plexiglass, policarbonato, entre otros. La agitación se lleva a cabo por medio de burbujeo de aire por uno de los lados a través de un tubo perforado, o bien, por rotación mecánica a través de un motor. El escalamiento de estos sistemas se da mediante la organización de varias placas de superficie para ganar área, el alargamiento de la placa no suele ser recomendad ya que resulta mejor el aumentar la altura del líquido y la ampliación de la trayectoria de la luz (Ramírez et al, 2013).

**Fotobiorreactores de tanque agitado.** Suele ser el más convencional, se emplean impulsores de diferentes tamaños y formas para permitir una agitación mecánica, se emplean deflectores para reducir el efecto torbellino; en el fondo se introduce la fuente de carbono, aire enriquecido con  $CO_2$  para el crecimiento de cianobacterias. Asimismo, es recomendable adaptar un sistema de iluminación interna para una distribución homogénea de luz, sin embargo, una de las desventajas del sistema es la baja relación entre la luz y volumen, lo que provoca una disminución en la eficiencia fotosintética (Ramírez et al, 2013).

**Figura 10.** Esquema representativo de las diferentes configuraciones de fotobiorreactores



*Nota.* A. sistema airlift; B. columna de burbujeo; C. tubular horizontal; D. tubular helicoidal; E. superficie plana; F. tanque agitado; G. tipo híbrido. Adaptado de Ramírez et al, (2013).

Sin embargo, existen otras configuraciones adaptadas a una mejor eficiencia en relación con la producción de biomasa, esto son los fotobiorreactores tipo híbridos y fotobiorreactores modificados para cianobacterias. Fotobiorreactores tipo híbridos. Suelen ser muy empleados debido a que se fusionan dos tipos de reactores, de modo que se complementan las ventajas y desventajas de los reactores empleados. En un reciente estudio se fusionaron un sistema airlift y uno tubular con loop externo, dispuestos horizontalmente en una piscina con agua a temperatura controlada, dicha disposición permite la recolección de luz y control de temperatura del cultivo. Con el sistema airlift funcionaba con un desgasificador y controlador de velocidad del flujo a través del circuito. Dentro de sus ventajas está el control de variables de cultivo, lo cual permite una mayor productividad y reducción de consumo energético (Ramírez et al, 2013).

## G. Método de aislamiento celular

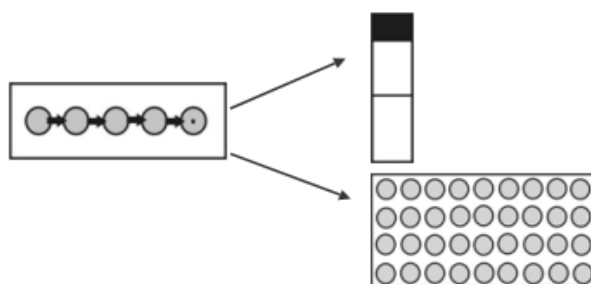
El aislamiento de cianobacterias tiene como objetivo la obtención de cultivos monoespecíficos a partir de una sola célula, filamento o quiste, para ello existen diferentes métodos, los cuales dependen de las dimensiones de las cianobacterias, su movilidad y su morfología. Los más utilizados son, aislamiento con micropipeta, placas de agar y diluciones sucesivas, mediante un banco de diluciones. Se recomienda emplear una combinación de dos o más de técnicas, para facilitar el aislamiento de un solo organismo. Para verificar que los resultados de la secuencia de operaciones del aislamiento se realicen con éxito, se precisa de la ayuda de un microscopio (Arredondo y Voltolina, 2010).

### Aislamiento con pipeta

El aislamiento con pipeta se suele emplear para separar fitopláctones mayores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro en forma de quistes, células vegetativas, dinoflagelados, formas coloniales o filamentosas. Este método consiste en el aislamiento del microorganismo con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida, o bien, con un capilar. Para lo cual se coloca una gota de una muestra de fitoplancton en un portaobjeto y se observa en microscopio, las células de interés se succionan por capilaridad en la micropipeta para transferirlas a un portaobjetos limpio o en una lámina excavada que tenga una gota de agua de mar estéril. Dicho procedimiento se repite al lavar la célula en medio o agua estéril, hasta obtener un solo tipo de células, para lo cual se requiere alrededor de cinco transferencias sucesivas (Arredondo y Voltolina, 2010).

Posterior a la realización de las transferencias, la célula aislada se coloca en una placa de pocillos múltiples o en tubo de ensayo con 2 o 5 mL de medio de cultivo estéril. Dicha técnica será recomendable para microorganismos con baja sensibilidad a la manipulación. Asimismo, es recomendable que las condiciones posteriores al aislamiento sean similares a las iniciales para evitar cambios bruscos, lo cual conlleva a realizar el procedimiento de forma rápida y cuidadosa. Se recomienda realizar pruebas con algunos otros microorganismos similares a los que se pretenden aislar, para seleccionar adecuadamente la iluminación, magnificación, tipo de la minillas y cantidad de muestra a emplear, con el objetivo de poder reconocer y capturar a la cepa de interés en un tiempo menor a 15 minutos (Arredondo y Voltolina, 2010).

**Figura 11.** *Aislamiento con pipeta Pasteur*

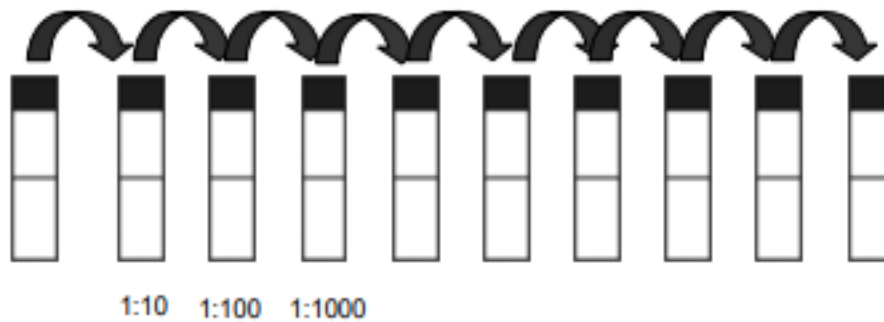


*Nota.* Adaptado de Arredondo y Voltolina (2010).

## Diluciones seriadas

Las diluciones seriadas se emplean cuando el fitoplancton posee un tamaño inferior a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y es útil para aislar especies que son abundantes en la muestra, para lo cual es necesario estimar la concentración celular de la especie antes de iniciar el procedimiento de aislar la cepa, esto con el fin de calcular el número de diluciones necesarias para poder reducir la concentración. Para realizar el procedimiento se toma 1mL de muestra original y se agrega a un tubo de ensayo que contenga 9mL de medio de cultivo estéril, se procede a homogenizar y luego se agrega 1mL a un segundo tubo con 9mL de medio, se homogeniza y de esta forma, sucesivamente se realizan las diluciones, el número depende de la concentración de la cianobacteria de interés a aislar y el intervalo de dilución que se emplea, normalmente de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ , dependerá de la densidad poblacional. En caso se tenga una concentración de cianobacterias baja, es recomendable emplear placas con pocillos múltiples con capacidad de 250  $\mu\text{L}$ , con diluciones sucesivas de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000; las transferencias se realizan en cada dilución y se observan los resultados en microscopio invertido o estereoscopio. La dilución se debe de realizar hasta obtener un organismo por 8-10mL, y después de 1 a 15 días de incubación, se toma una muestra para observarla bajo microscopio y con ello determinar si es necesario repetir el proceso hasta obtener un cultivo puro de la cepa de cianobacteria de interés (Arredondo y Voltolina, 2010).

**Figura 12.** Aislamiento por dilución seriada en tubos de ensayo



*Nota.* Adaptado de Arredondo y Voltolina (2010), capítulo 1.

## Aislamiento en placas de Agar

Diversas especies de microalgas y cianobacterias pueden ser aisladas por medio de la técnica de rayado en estrías en cajas de Petri con agar, este método permite purificar los cultivos contaminados con otros microorganismos como zooplancton, sin embargo, no todas las especies pueden mantenerse en medio sólido, como las especies flageladas y algunas diatomeas, y en especies como bentónicas, clorofitas, cocoidales y cianofitas, si presenta buenos resultados. Para ello es necesario preparar el medio de cultivo sólido apropiado, adicionado entre 0.8 y 2% de agar. Se procede a esterilizar en autoclave, se deja enfriar a temperatura ambiente y antes de solidificar, se vacía en cajas de Petri estériles. Se colocan alrededor de una o dos gotas de muestra en las cajas de medio sólido y se esparcen

con un asa bacteriológica o bien, con una varilla de vidrio doblada, con previa esterilización. Se procede a cubrir la caja con su respectiva tapa, se invierte y se coloca en un ambiente con temperatura y luz controladas, se debe incubar de 4 a 8 días, luego se observan bajo microscopio invertido o estereoscopio, con la ayuda del asa se seleccionan las colonias libres de otros microorganismos, y se transfieren a otra caja de Petri. Esto se deberá realizar las veces que sean necesarias para obtener resultados exitosos en el aislamiento de una cepa específica, y se recomienda combinar con la técnica de diluciones seriadas (Arredondo & Voltolina, 2010).

## **H. Método de fluorescencia para conteo celular de cianobacterias**

El método de fluorescencia para conteo celular de cianobacterias es empleado para cuantificar la cantidad de células presentes en un cultivo de dichos microorganismos, para ello se puede emplear el equipo MUSE®. Dicho equipo es un analizador de células que emplea la tecnología de detección fluorescente miniaturizada y la tecnología microcapilar, de modo que analiza cuantitativamente las células en una suspensión que presentan un tamaño de 2 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro. Con dicho equipo se puede obtener un análisis con rendimientos altos y se evalúa hasta 3 parámetros celulares, tales como tamaño celular y la presencia de los colores rojo y amarillo. El procedimiento a seguir es colocar dentro del equipo una muestra de 1 mL del medio de cultivo, el capilar entra en contacto con ella y un láser verde emitido a través del capilar, cuantifica la cantidad de células presentes en la muestra. Asimismo, con dicho análisis, también se logra la cuantificación de células totales, células viables y el porcentaje de viabilidad (Millipore Sigma, 2016).

## **I. Curvas de crecimiento bacteriano**

Una curva de crecimiento permite establecer una cinética de crecimiento bacteriano y la fisiología celular, lo cual ayuda a determinar la respuesta de los microorganismos en condiciones de crecimiento variables y definir parámetros de crecimiento óptimos para una bacteria determinada. Una curva de crecimiento arquetípico presenta cuatro fases de crecimiento: retraso (lag), exponencial, estacionario y muerte (Van *et al*, 2024).

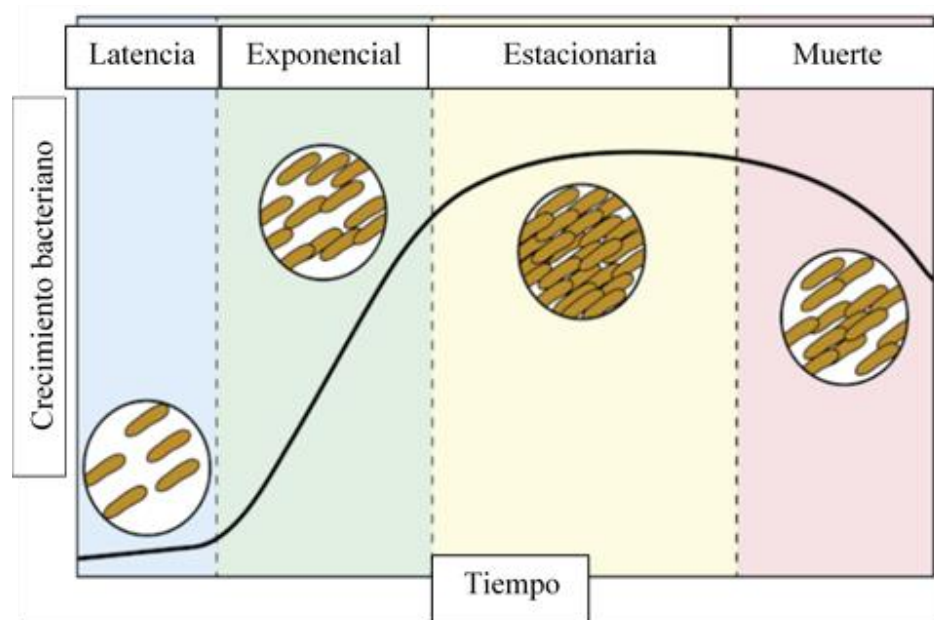
Fase de retraso: dicha fase es el periodo de tiempo que el microorganismo tarda en alcanzar un estado fisiológico capaz de crecimiento celular rápido o división (Van *et al*, 2024).

Fase exponencial: dicha fase es en donde se da un crecimiento y división celular más rápido al realizarse la replicación del ADN, transcripción de ARN y la producción de proteínas se lleva a cabo a un ritmo constante y rápido (Van *et al*, 2024).

Fase estacionaria: dicha fase se caracteriza por una ralentización y meseta del crecimiento de microorganismos, lo cual es debido a la limitación de nutrientes y una posible acumulación intermedia de toxinas (Van *et al*, 2024).

Fase de muerte: dicha fase se caracteriza porque se produce una lisis celular, producto de la limitación severa de nutrientes en el medio de cultivo (Van *et al*, 2024).

**Figura 13.** Fases de una curva de crecimiento bacteriano



*Nota.* Adaptado de Van et al, (2024).

## **J. Identificación bacteriana mediante la secuenciación de ARNr 16S**

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es una macromolécula comúnmente empleada en estudio de filogenia y taxonomía bacterianas. Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, por lo que constituye una diana universal para su identificación. Es importante mencionar que la secuenciación del ADNr 16S no aporta siempre una identificación definitiva a nivel especie. Dicho método molecular de identificación presente tres etapas: amplificación del gen a partir de una muestra apropiada, determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y el análisis de la secuencia (Rodicio & Mendoza, 2004).

Amplificación: la amplificación del ADNr 16S es posible con un termociclador, debido a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde se emplea como sustrato el ADN purificado a partir de un cultivo puro del microorganismo. Para la extracción del ADN bacteriano existen protocolos, pero es posible que se requieran modificaciones en función de la bacteria (Rodicio & Mendoza, 2004).

Oligonucleótidos iniciadores: para llevar a cabo la amplificación del ADNr 16S completo, se emplean iniciadores diseñados con base en secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, lo cual origina amplicones de 1,500 pb (Rodicio & Mendoza, 2004).

Secuenciación del amplicón: durante este procedimiento, se llevan a cabo las reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis (Rodicio & Mendoza, 2004).

Análisis de la secuencia: durante esta etapa, se compara la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos. En la actualidad existen distintas bases de datos con acceso libre en internet, tales como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), y otras privadas, como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System) (Rodicio & Mendoza, 2004).

## **K. NCBI – Blast**

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), proporciona acceso a recursos computacionales los cuales permiten conocimiento de sistemas biológicos, además, en éste se incluyen diversos repositorios de secuencias genómicas y proteínicas, citas, resúmenes científicos, entre otros. Se trata de un repositorio que pertenece a la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de América, fue creado en 1988 para desarrollar sistemas de información en materia de biología molecular, mantiene base de datos de GenBank, la cual contiene secuencias de ácidos nucleicos y proteínas (Guzmán *et al*, 2023).

La herramienta básica de búsqueda de alineación local BLAST es una herramienta que encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. Dicho programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y con ello, calcula la significancia estadística. BLAST permite inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, incluso permite ayudar a identificar miembros de familias de genes (NCBI, 2023).

## V. Antecedentes

Estudios anteriores han demostrado la relevancia del aislamiento de cianobacterias de cuerpos de agua, suelos y demás ambientes naturales, en donde se evidencia el crecimiento de fitoplancton, el cual permite ampliar el espectro de microorganismos utilizados para la obtención de diferentes beneficios. Según lo reportado por Martínez P. (2014) la evaluación de consorcios con cianobacterias aisladas de suelos agrícolas, pueden determinar viabilidad y potencial como biofertilizante. En este estudio se llevó a cabo el aislamiento de cianobacterias en medio BG11o, de muestras tomadas de leguminosas completas con su raíz y rizósfera, cultivadas en la Parroquia Poaló la cual se ubica en la ciudad de Latacunga, Provincia de Cotopaxi. Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno que lograron aislar fueron *Nostoc sp.*, *Anabaena sp.* y *Calothrix sp.*

Asimismo, Llano, Meichtry & Tonon (2005) desarrollaron un método para el aislamiento y purificación de ADN de *Microcystis spp.* con lo cual tenían como objeto realizar un protocolo de trabajo eficaz y rápido, que presente resultados óptimos para la extracción y purificación de ADN de la cepa mencionada anteriormente, puesto que es uno de los géneros más representativos de las cianobacterias tóxicas. Para lo cual obtuvieron resultados y pureza de ADN dentro de los rangos aceptables para la mayoría de las técnicas moleculares de genotipificación.

En la actualidad podemos observar cuerpos de agua dulce, que son un recurso natural invaluable en diversos aspectos como económicos, culturales, educativos, estéticos y científicos, en los cuales se han experimentado cambios en la biodiversidad, calidad y cantidad por actividades humanas que ocasionan contaminación destrucción y degradación de hábitats. Por lo que, en la región nororiental del Perú, se desarrolló el aislamiento y caracterización molecular y bioquímica de una cianobacteria presente en el cuerpo de agua, esto es la *Anabaena sp.* específicamente del río Amazonas, Loreto-Perú. Las investigaciones se enfocan en la identificación y caracterización de microalgas y cianobacterias ya que estos requieren un esfuerzo continuo, debido a que solo se conservan pocos miles de colecciones de cultivos de microalgas en todo el mundo, de los cuales solo unos pocos han sido investigados por su composición bioquímica (Grandez *et al*, 2021).

## **VI. Metodología**

### **Fase de campo**

#### **Colección y transporte de muestras**

La cuenca del lago de Atitlán es de tipo endorreica y cuenta con el cuerpo de agua más profundo de Centroamérica, ubicado en las coordenadas geográficas 14°42'0" N y 91°12'0" W en formato DMS (grados, minutos, segundos). Es un sistema tropical profundo de forma cóncava, con una profundidad de 327.56 m, y una media de 203.21 m.

Se realizaron monitoreos en conjunto con el Centro de Estudios Atitlán (CEA) de la Universidad del Valle de Guatemala, Campus Altiplano, con apoyo de la Licenciada Mónica Martínez Fausto (investigadora asistente) y AMSCLAE, durante enero, abril y agosto del 2023, con el fin de obtener muestras significativas que permitieran la identificación y aislamiento de una cepa específica en el cuerpo de agua. Se observó que durante enero y marzo no hubo florecimiento abundante de cianobacterias debido a las condiciones atmosféricas que presentaba el cuerpo de agua, sin embargo, había una baja presencia de cianobacterias. Durante agosto se evidenciaron florecimientos de cianobacterias favorables ya que se presentaban temperaturas promedio de  $22.42^{\circ}\text{C} \pm 1 * 10^{-7}^{\circ}\text{C}$ , un pH promedio de  $6.55 \pm 1 * 10^{-7}$  (CEA, 2023).

La colecta se realizó con un arrastre sobre la superficie del lago de Atitlán y la introducción de redes de nanoplancton con porosidad de 25  $\mu\text{m}$  (Figura 24, Anexos). Las muestras fueron almacenadas en un garrafón de plástico. Posteriormente, con la ayuda de una red de nanoplancton de 10  $\mu\text{m}$  (Figura 25, Anexos), se obtuvo un concentrado de los microorganismos, los cuales fueron almacenados en recipientes de vidrio y transportados en una hielera a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  del departamento de Sololá hasta la ciudad capital para ser procesados en el laboratorio.

### **Fase de laboratorio**

#### **Procesamiento de muestras de agua del lago de Atitlán**

Las muestras fueron separadas en dos erlenmeyers de 500 mL. Se obtuvo un volumen total de 900 mL de muestra por lo que el erlenmeyer 1 tenía 400 mL de muestra y el erlenmeyer 2, 500 mL. Se le agregó solución de rápido crecimiento a una proporción de 1% del volumen total, dicha solución presenta la siguiente composición: fosfato ( $PO_4$ ), nitrato ( $NO_3$ ), amonio ( $NH_4$ ), dióxido de silicio ( $SiO_2$ ); 4 mL y 5 mL respectivamente a cada Erlenmeyer. Esta solución de rápido crecimiento fue proporcionada por el Centro de Estudios Atitlán.

Dichas muestras se mantuvieron dentro de una incubadora Fisher Scientific bajo condiciones controladas con temperatura de 22°C y fotoperiodos de 12:12 horas luz-oscuridad (Figura 27, Anexos) con luz roja tipo regleta para aumentar la población de microorganismos presentes y llevar a cabo el aislamiento de una cepa específica.

### **Preparación de medio BG11 formulado líquido y sólido**

Se preparó un medio BG11 formulado líquido y sólido para el crecimiento inicial de las cepas a aislar de cianobacterias, ya que, al ser un cultivo a pequeña escala, la formulación permitía un crecimiento favorable y adecuado por el volumen a emplear. Para los cultivos en fotobiorreactores, se empleó el medio BG11 Broth 100x (medio comercial concentrado) que se explicará más adelante.

### **Materiales y equipo**

- Stocks formulados para la elaboración de Medio BG11 (según Cuadro 1)
- 1.5 g de Agar-Agar por cada 100 mL
- Agua potable
- Micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L
- Puntas de Micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L
- 8 cacas de Petri (20-25 mL/caja)
- Balón aforado de 1 L con tapa
- Frasco con tapa de 1 L
- 5 Erlenmeyers de 250 mL
- 1 Erlenmeyer de 500 mL
- Probeta de 250 mL
- Cinta testigo
- Papel encerado
- Estufa
- Agitador magnético
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV
- Balanza analítica Pioneer OHAUS
- Espátula analítica
- Campana de extracción
- Aluminio
- Piseta de agua destilada
- Solución *NaOH* 0.01 M
- Tiras de pH
- Balón aforado
- Pipeta Pasteur

### **Procedimiento**

1. Se prepararon los Stocks para formular el medio BG11 según el siguiente cuadro:

**Cuadro 1.** Preparación de Stocks para formulación del Medio BG11

No. Stock (volumen solución final:100 mL)	Compuesto	Cantidad (g)
Stock 1	$Na_2Mg$ EDTA	0.1
	Citrato de amonio férrico	0.6
	Ácido cítrico	0.6
	$CaCl_2 * 2H_2O$	3.6
Stock 2	$MgSO_4 * H_2O$	7.5
Stock 3	$K_2HPO_4$	3.05
Stock 4	$MnCl_2 * 4H_2O$	1.81
	$ZnSO_4 * H_2O$	0.222
	$CuSO_4 * 5H_2O$	0.079
	$CoCl_2 * H_2O$	0.050
	$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	0.391
Stock 5 (se agrega de último a un litro de medio final)	$NaNO_3$	1.5
	$Na_2CO_3$	0.02
Stock 6	$H_3BO_3$	2.85

*Nota.* \*Cantidades de compuestos para formulación de Stocks. Todas las sales se disuelven en 100 mL de agua autoclaveada (con excepción del Stock 5) para generar 100 mL de Stock.

**Cuadro 2.** Cantidades de Stock para preparar 1L de medio de cultivo BG11

No. De Stock	Cantidad
1	1 mL
2	1 mL
3	1 mL
4	300 $\mu$ L
5	1.5 g $NaNO_3$ 0.02 g $Na_2CO_3$
6	100 $\mu$ L

*Nota.* \*Si se desea medio sólido agregar 1.5% Agar-Agar (1.5 g Agar-Agar para 100 mL de medio BG11).

- Utilizando erlenmeyers de 125 mL, se preparó cada Stock de acuerdo con el cuadro 1 con ayuda de la balanza analítica, espátula analítica y papel encerado para realizar los pesajes requeridos y agua destilada.
- Una vez preparado cada Stock, se procedió a autoclavar todas las soluciones. En la misma corrida, se autoclavearon las puntas de micropipeta, agua potable, cristalería e instrumentos a emplear para realizar el medio, debidamente cubiertos con papel aluminio para evitar contaminación posterior a su esterilización.
- En un balón aforado de 1 L se preparó el medio de cultivo BG11 según las proporciones que se presentan en el Cuadro 2, se aforó con agua potable

- autoclaveada previamente y se homogenizó la solución, luego se trasvasó hacia el frasco con tapa de 1 L.
5. Se midió 250 mL del medio de cultivo preparado en el paso anterior y se trasvasó a un Erlenmeyer de 500 mL, se procedió a pesar 3.75 g de Agar-Agar y se agregó al Erlenmeyer, se colocó un agitador magnético dentro y se tapó con aluminio. Se llevó a ebullición la solución para disolver dicho agar (aproximadamente 20 minutos en la estufa).
  6. Se retiró el agitador magnético, se volvió a tapar con aluminio y se le colocó cinta testigo.
  7. Se colocó cinta testigo en el frasco con el medio de cultivo BG11.
  8. Se procedió a autoclavar los medios a 121°C por 15 minutos.
  9. Se dejó enfriar el medio líquido y se procedió a preparar la solución de NaOH 0.01 M, para lo cual se pesó 0.05 g de NaOH y se vertió en un balón aforado de 125 mL, luego se aforó con agua destilada y se homogenizó la solución.
  10. Se midió el pH del medio de cultivo BG11 y con la ayuda de una pipeta Pasteur se ajustó con la solución de NaOH 0.01 M hasta obtener un pH de 7.5
  11. Luego se refrigeró el medio de cultivo BG11 con pH ajustado hasta su empleo.
  12. El medio sólido se dejó enfriar hasta una temperatura tibia y luego se vertió en cajas Petri. Se emplearon 8 cajas Petri, 2 por cada muestra recolectada del Lago de Atitlán.
  13. Se esperó a que se solidificara el medio sólido, se les colocaron sus respectivas tapas y se guardaron en una manga plástica y se identificó con Nombre del medio, Nombre del estudiante y Fecha de realización del medio. Se enviaron a refrigeración hasta su empleo.

### **Aislamiento de cianobacterias de muestras de agua del lago de Atitlán de enero, marzo y agosto en placas de Petri**

#### **Materiales y equipo**

- Medio de cultivo BG11 sólido (placas de Petri)
- Muestras de agua del Lago de Atitlán (enero, marzo y agosto)
- Asa microbiológica
- Mechero de metanol
- Encendedor
- Microscopio estereoscopio Premiere
- Incubadora
- Luz roja tipo regleta
- Temporizadores
- Papel Parafilm
- Marcador
- Cinta adhesiva
- Cloro al 10%
- Etanol al 70%

## **Procedimiento**

1. Se desinfectó el área de trabajo con cloro al 10% y etanol al 70% y se encendió el mechero.
2. Se etiquetaron las cajas de Petri con Nombre, Fecha de siembra, No. De muestra, y Tipo de medio.
3. Se esterilizó el asa microbiológica y se tomó una asada de la primera muestra del Lago de Atitlán. Luego se realizó la siembra en una caja de Petri con medio sólido BG11 por estría cruzada y se cerró con una tira de papel Parafilm.
4. Se repitieron los pasos 1 al 3 para cada una de las muestras.
5. Se procedió a incubar las cajas de Petri por 30 días, se colocaron boca abajo las cajas para evitar contaminación por vapores que queden en la tapa.
6. El equipo de incubación se cubrió con cartón chip y se colocó la lámpara roja dentro del sistema, de modo que se mantuviera un fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad y una temperatura de 30°C.
7. Pasado el tiempo de incubación, las cajas Petri se observaron bajo un microscopio estereoscopio para verificar presencia de colonias de cianobacterias.
8. Dicho procedimiento se repitió para las muestras extraídas para los meses de enero, marzo y agosto.

## **Aislamiento de cianobacterias de muestras de agua del lago de Atitlán de enero y marzo por medio de diluciones seriadas**

### **Materiales y equipo**

- Medio de cultivo BG11 formulado
- Muestras de agua del Lago de Atitlán (enero y marzo)
- Micropipeta de 10 a 100  $\mu$ L
- Puntas de micropipeta de 10 a 100  $\mu$ L
- Caja para puntas de micropipeta
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV
- 5 tubos Eppendorf de 1 mL
- Frasco de vidrio con tapa
- Cinta testigo
- Cinta adhesiva
- Marcador
- Microscopio LEICA DM500
- Portaobjetos
- Luz roja tipo regleta
- Temporizador
- Etanol al 95%
- Campana de extracción
- Gradilla
- Beaker para descarte de puntas de micropipeta

## Procedimiento

1. En el frasco de vidrio se introdujeron los tubos Eppendorf de 1 mL, se cerró y se le colocó cinta testigo. En una caja tipo gradilla se introdujeron las puntas de micropipeta de 10 a 100  $\mu\text{L}$ , se sellaron con cinta adhesiva y se les colocó cinta testigo. Se autoclavearon a 121°C por 15 minutos.
2. Se desinfectó la campana de extracción, se encendió y se procedió a colocar todo el material, equipo y cristalería a emplear.
3. Se etiquetaron los tubos Eppendorf de 1 mL con el no. de dilución (1:1; 1:10; 1:100; 1:1,000; 1: 10,000). Y se colocaron en una gradilla.
4. A cada tubo Eppendorf se le adicionó 900  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con ayuda de la micropipeta de 10 a 100  $\mu\text{L}$ . Se descartó la punta empleada.
5. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra de microorganismos del Lago de Atitlán, y se adicionaron al primer tubo Eppendorf etiquetado con “1:1”. Con ayuda de la micropipeta y una punta nueva se homogenizó el cultivo. Luego se descartó dicha punta.
6. Con la micropipeta y una punta nueva, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del tubo Eppendorf “1:1” y se trasvasó hacia el tubo Eppendorf “1:10”. Se homogenizó y se descartó la punta.
7. Se repitió el paso 6 para los tubos etiquetados con “1:100”, “1:1000” y “1:10000”. Para ello se siguió el procedimiento establecido para realizar diluciones seriadas como se observa en el Cuadro 3.
8. Los tubos se colocaron en un frasco de vidrio sin tapa, se dejaron incubar por 22 días a la intemperie con luz roja tipo regleta y se cumplió con un fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad a una temperatura de 19°C (temperatura del laboratorio).
9. Cumplido el tiempo de incubación, se procedió a observar las diluciones bajo microscopio con objetivo de 40x.

**Cuadro 3.** *Diluciones seriadas para aislamiento de Cianobacterias*

No. Dilución	Volumen de inóculo	Volumen medio de cultivo BG11
1:1	100 $\mu\text{L}$ de muestra cruda	900 $\mu\text{L}$
1:10	100 $\mu\text{L}$ de 1:1	900 $\mu\text{L}$
1:100	100 $\mu\text{L}$ de 1:10	900 $\mu\text{L}$
1:1000	100 $\mu\text{L}$ de 1:100	900 $\mu\text{L}$
1:10000	100 $\mu\text{L}$ de 1:1000	900 $\mu\text{L}$

## Identificación y aislamiento de las cepas de cianobacterias presentes en las muestras de agua del lago de Atitlán en agosto

Para la identificación de las cepas, se tenía conocimiento que las muestras a procesar eran de los florecimientos del mes de agosto, en donde se observó bajo el microscopio una mayor presencia de la cepa de *Microcystis* y *Limnoraphis*. Por lo tanto, se esperaba aislar colonias o células de dichos microorganismos.

## Materiales y equipo

- Muestras de agua del Lago de Atitlán
- Microscopio LEICA DM500
- Portaobjetos
- Pipeta Pasteur
- Mechero de metanol
- Encendedor
- 5 tubos de ensayo de 5 mL
- Gradilla
- Etanol al 95%
- Papel aluminio
- Cinta adhesiva
- Marcador
- Medio de cultivo BG11
- Probeta de 10 mL
- Incubadora Fisher Scientific
- Tira de luz roja led
- Temporizador
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV
- Cinta testigo

### **Procedimiento**

1. La cristalería por emplear se cubrió con papel aluminio y se le colocó cinta testigo para autoclavar a 121°C por 15 minutos.
2. Se desinfectó el área de trabajo con etanol al 95% y se encendió el mechero. Se colocó todo el equipo, cristalería y material que se emplearía en la identificación y aislamiento.
3. En cada tubo de ensayo se agregó 5 mL de medio de cultivo BG11 medidos con una probeta de 10 mL. Se tapó cada tubo con papel aluminio y se rotularon para identificar las muestras aisladas en caso de tener variedad de cepas, y con el Nombre, Fecha de cultivo, No. de muestra y tipo de medio.
4. Se tomó una colonia de microorganismos y se colocó sobre un portaobjeto, se observó bajo el microscopio para apreciar su morfología, tamaño y características generales para poder identificarla.
5. Al identificar una cepa específica, se procedió a trasladarla a un tubo de ensayo con la ayuda de una pipeta Pasteur.
6. Se repitieron los pasos 3 y 4 hasta obtener 30 a 50 colonias de cianobacterias en cada tubo de ensayo.
7. Se colocaron los tubos de ensayo en una incubadora con temperatura de 22°C (la respectiva al Lago de Atitlán), el equipo de incubación se cubrió y se colocó la tira de luz roja led dentro, de modo que se mantuviera un fotoperiodo de 12:12 horas (luz: oscuridad).
8. Pasado el tiempo de incubación (aproximadamente 22 días), se monitoreó el crecimiento de las cianobacterias (Figura 28, anexos) para proceder a la propagación de la cepa de interés.

## **Propagación de inóculos a volúmenes de 50 mL y 500 mL**

Durante el tiempo de incubación (aproximadamente 30 días) de los tubos de ensayo con las colonias de cianobacterias, se escogió el inóculo con mayor crecimiento ya que se observó mayor biomasa y coloración en el medio. Asimismo, se observó un mejor crecimiento fuera de la incubadora por lo que el crecimiento a volúmenes de 50 y 500 mL se llevó a cabo fuera de incubadora, en el laboratorio con su luz respectiva y fotoperiodos, a una temperatura de 19°C (temperatura del laboratorio).

### **Materiales y equipo**

- 2 beaker de 50 mL
- 2 beaker de 500 mL
- Tubos de ensayo con inóculo inicial
- Solución de rápido crecimiento ( $PO_4 + NO_3 + NH_4 + SiO_2$ )
- Probeta de 10 mL
- Papel aluminio
- Cinta adhesiva
- Marcador
- Medio de cultivo BG11
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 1000 mL
- Luz roja tipo regleta
- Etanol al 95%
- Campana de extracción
- Mechero de metanol
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV
- Cinta testigo

### **Procedimiento**

1. La cristalería por emplear se cubrió con papel aluminio junto con el medio de cultivo BG11 se le colocó cinta testigo para autoclavar a 121°C por 15 minutos.
2. Se desinfectó la campana de extracción con etanol al 95% y se encendió el mechero de metanol. Luego se colocó todo el material a emplear en el procedimiento.
3. Se escogieron los tubos con mayor crecimiento de biomasa, y se agregaron a los beakers de 50 mL.
4. Se procedió a medir 40 mL de medio de cultivo BG11, ya que cuatro tubos presentaban crecimiento adecuado de biomasa, y cada uno presentaba un volumen de 5 mL. Se vertieron dos tubos en cada beaker de 50 mL. Luego se vertió el medio en cada beaker y se cubrió con papel aluminio de modo que se permitiera el intercambio de gases con la atmósfera.
5. Se identificó cada beaker con el tipo de muestra, Nombre, Fecha de cultivo y tipo de medio.
6. Se dejaron incubar por 22 días a la intemperie en el laboratorio con la luz roja tipo regleta con fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad y temperatura de 19°C (temperatura del laboratorio).

7. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a propagar los cultivos a 500 mL.
8. Para ello se midió 450 mL de medio de cultivo BG11 para cada beaker de 500 mL. Se agregó 5 mL de solución de rápido crecimiento medidos con una probeta de 10 mL.
9. Luego a cada beaker de 500 mL se agregó el inóculo de 50 mL preparado en los pasos 2 al 6.
10. Se cubrieron los beakers de 500 mL con papel aluminio, se identificaron con el tipo de muestra, Nombre, Fecha de cultivo y tipo de medio.
11. Se dejaron incubar por 22 días a la intemperie con luz roja tipo regleta con fotoperiodos de 12:12 horas luz-oscuridad a una temperatura de 19°C (temperatura del laboratorio). Es importante mencionar que, con la luz roja, la temperatura alcanza 22°C en el medio, la cual es adecuada para las cianobacterias.

### **Preparación de medio BG11 Broth 100x (Medio comercial concentrado)**

#### **Materiales y equipo**

- 1 beaker de 5000 mL
- 1 Erlenmeyer de 5000 mL
- Medio BG11 Broth 100x (Medio comercial concentrado)
- Solución de *NaOH* 1 M
- Balón aforado de 125 mL
- Papel encerado
- Balanza analítica Pioneer OHAUS
- Espátula analítica
- pH-metro PCSTestr 35 Multi-Parameter
- Estufa
- Agitador magnético
- Agua estéril de filtro UV
- Papel aluminio
- Etanol al 95%
- Probeta de 1000 L
- Beaker de 5 mL
- Piseta de agua destilada

#### **Procedimiento**

1. Se desinfectó el área de trabajo con etanol al 95%.
2. Se procedió a lavar la cristalería con agua y jabón, luego se roció etanol al 95% para eliminar impurezas y posible contaminación. Luego se enjuagó la cristalería con abundante agua destilada hasta retirar el etanol. Se dejó secar y se cubrió con papel aluminio.
3. Se preparó la solución de *NaOH* 1 M, pesando 3.1242 g de *NaOH* para un volumen de 125 mL en un balón aforado, se aforó con agua destilada y se homogenizó.
4. Con la ayuda de una probeta de 1000 mL se trasvasaron 4450 mL de agua esterilizada con filtro UV a el beaker de 5000 mL y el Erlenmeyer de 5000 mL, se cubrieron con papel aluminio.

5. Con una probeta de 100 mL se midió 50 mL del medio de cultivo BG11 Broth 100x, ya que según las instrucciones del medio se tiene que disolver el medio en 1:100 con agua esterilizada.
6. Luego se vertió el medio en el Erlenmeyer de 5000 mL y el beaker de 5000 mL, se colocaron ambos recipientes en una estufa y se agitó la solución con un agitador magnético hasta homogenizar la mezcla.
7. Se retiraron de la estufa los recipientes con el medio de cultivo y se retiró el agitador magnético.
8. Se procedió a encender el pH-metro y se introdujo en los medios de cultivo, se ajustó el pH a 7.5 con la solución de NaOH 1 M.
9. Se lavó el pH-metro con agua destilada en el beaker de 5 mL.
10. Ya ajustado el pH del medio de cultivo, se cubrió la cristalería con papel aluminio hasta emplear para las corridas en los fotobiorreactores.

## **Cultivo de cianobacterias en fotobiorreactores BioVantage Resources**

### **Materiales y equipo**

- 2 fotobiorreactores de 8 L BioVantage Resources
- Inóculos de cianobacterias en Erlenmeyers de 500 mL
- Medio de cultivo BG11 Broth
- Agua destilada
- Etanol al 95%
- Papel aluminio
- Luz roja tipo regleta
- Temporizador
- Precintos de nylon

### **Procedimiento**

1. Se lavaron los fotobiorreactores con jabón y agua, se les roció etanol al 95% para eliminar cualquier contaminante, y luego se procedió a retirar el etanol con abundante agua destilada. Se repitió el proceso para los difusores, estos se limpiaron con un cepillo de dientes. Se rotularon los fotobiorreactores como “Reactor 1” y “Reactor 2”, respectivamente.
2. Se colocaron las barras de luz roja tipo regleta una enfrente de cada fotobiorreactor sujetadas con precintos de nylon en la estructura de metal de los fotobiorreactores
3. Se vertió el medio de cultivo BG11 Broth, previamente preparado, se adicionó el inóculo de 500 mL de cianobacterias para producir un volumen efectivo de 5 L de fermentación, y se cerró el fotobiorreactor. Este procedimiento se repitió para el segundo fotobiorreactor.
4. Se ajustó el flujo de aire a  $0.4247 \text{ m}^3/\text{h}$  y se encendieron las luces rojas con un fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad.
5. Se dejó correr la fermentación durante 17 días.

## **Toma de muestras para medición de pH, viabilidad y concentración celular**

El siguiente procedimiento se realizó para cada día de toma de muestras (17 días), se realizaron en triplicado para dos corridas de fermentación (dos fotobiorreactores).

### **Materiales y equipo**

- 6 tubos de ensayo de 5 mL.
- Marcador.
- Cinta adhesiva.
- 2 fotobiorreactores de 8 L Biovantage Resources.
- Refrigeradora.
- Gradilla.

### **Procedimiento**

1. Se procedió a lavar los tubos de ensayo con agua y jabón, luego con etanol al 95% y se retiró el etanol con abundante agua destilada.
2. Se rotularon los tubos de ensayo con el número de muestra, el tipo de muestra, la fecha de toma de muestra y número de reactor.
3. Se refrigeraron en una gradilla hasta el momento de su análisis.

## **Medición en el equipo MUSE® para conteo celular y análisis de viabilidad**

### **Materiales y equipo**

- Contador de células Muse®.
- Vortex.
- Piseta de agua destilada.
- Tubos de ensayo con muestras del cultivo de cianobacterias.
- 1 micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L.
- Puntas de micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L.
- Piseta de cloro.
- Recipiente con Guava ICF.
- Computadora.
- Microsoft Excel.

### **Procedimiento**

1. Se encendió el equipo Muse ®.
2. Se seleccionó la cuenta personal y se ingresó el PIN de acceso.
3. Se seleccionó la opción “Muse System Cleaning”.
4. Se seleccionó la opción “Complete System Clean”.
5. Se seleccionó la opción “Run Complete Clean”.
6. Se retiró el tubo con agua destilada y se colocó un nuevo tubo con Guava ICF.
7. Se seleccionó la opción “Run” y se esperó a terminar el procedimiento.
8. Se retiró el tubo con Guava ICF y se colocó un tubo con agua destilada fresca.

9. Se seleccionó la opción “Continue” y se esperó a terminar el procedimiento.
10. Se seleccionó “Finish”, una vez terminado el procedimiento.
11. Posteriormente, se seleccionó “Home”, seguido de “Count & Viability” y se seleccionó el archivo correspondiente para guardar la muestra a analizar.
12. Luego, se seleccionó “Next Run” y se retiró el tubo con agua destilada para introducir la muestra a analizar.
13. Se preparó el tubo con 1mL de muestra.
14. Se seleccionó “Continue”; luego, se esperó el análisis del conteo celular y viabilidad; se anotó el resultado en una hoja de Excel.
15. Se repitió el mismo procedimiento con todas las muestras.
16. Al finalizar las lecturas, se realizó el protocolo de limpieza en “Complete System Clean” de los pasos 1 al 10 y se dejó un tubo de agua destilada dentro del equipo.
17. Se seleccionó “Essential Tools”, seguido de “Power Options”, finalmente, “Power Off” para apagar el equipo.

\*Es importante que con cada corrida se verifiquen los niveles de desechos y limpieza del equipo.

## **Medición de pH de las muestras**

### **Materiales y equipo**

- Tubos de ensayo con muestras del cultivo de cianobacterias
- Gradilla
- Beaker de 5 mL
- Piseta de agua destilada
- pH-metro PCSTestr 35 Multi-Parameter
- Beaker de desechos
- Etanol al 95%
- Cronómetro
- Computadora
- Microsoft Excel

### **Procedimiento**

1. Se procedió a desinfectar el área de trabajo con etanol al 95% y se colocó todo el material, equipo y cristalería a emplear.
2. Se encendió el pH-metro y se vertió la muestra en un beaker de 5 mL. Se dejó por 3 minutos el pH-metro en la muestra y se anotó la medición de pH en una hoja de Excel.
3. Se lavó el pH-metro con agua destilada sobre el beaker de desechos.
4. Se repitió el procedimiento para todas las muestras de cada día y corrida del cultivo de cianobacterias de los fotobiorreactores.

## **Preparación de muestras para secuenciar el ADN**

### **Propagación de inóculo inicial**

Para llevar a cabo el procedimiento se procedió a tomar el tubo de ensayo sobrante del aislamiento inicial de las muestras del lago, con las colonias de cianobacterias identificadas y se propagó para tener suficiente biomasa para enviar a secuenciar el ADN.

### **Materiales y equipo**

- Tubo de ensayo con inóculo de cianobacterias
- Erlenmeyer de 50 mL
- Medio de cultivo BG11 formulado
- Papel aluminio
- Marcador
- Cinta adhesiva
- Probeta 100 mL
- Etanol al 95%
- Campana de extracción
- Luz roja tipo regleta
- Temporizador
- Autoclave Tuttnauer 2840ELV
- Cinta testigo
- Campana de extracción

### **Procedimiento**

1. Se procedió a autoclavar la cristalería a emplear tapada con aluminio y con cinta testigo, a 121°C por 15 minutos.
2. Se desinfectó la campana de extracción con etanol al 95%.
3. Se colocó el material y cristalería a emplear.
4. Se midió 45 mL de medio de cultivo BG11 formulado y se vertió en el Erlenmeyer de 50 mL.
5. Se procedió a inocular el Erlenmeyer con el tubo de ensayo que contenía el cultivo de cianobacterias.
6. El Erlenmeyer se cubrió con papel aluminio y se etiquetó con el Nombre de la muestra, Tipo de medio, Nombre y Fecha de realización del cultivo.
7. Se incubó por 22 días a la intemperie dentro del laboratorio frente a la luz roja tipo regleta con fotoperiodos de 12:12 horas luz-oscuridad.

### **Extracción de ADNg para secuenciación**

#### **Materiales y equipo**

- Cultivo de cianobacterias en Erlenmeyer de 50 mL (Apartado anterior)
- Muestras de los fotobiorreactores con cultivo de cianobacterias
- Mortero
- Nitrógeno líquido
- Etanol al 95%
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Espátula analítica

- Autoclave Tuttnauer 2840ELV
- Cinta testigo
- Frasco de vidrio con tapa
- Tubo cónico Eppendorf de 50 mL
- Marcador
- Campana de extracción
- Pipeta Pasteur
- Guantes de nitrilo
- Lentes de protección
- Sobre de papel craft

### **Procedimiento**

1. Los tubos Eppendorf de 1.5 mL se colocaron abiertos dentro de un frasco de vidrio con tapa, se le colocó cinta testigo y se enviaron a la autoclave a 121°C por 15 min.
2. Se desinfectó la campana de extracción con etanol al 95% y se colocó todo el material y cristalería a emplear. Y se procedió a colocarse guantes de nitrilo y lentes de protección.
3. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se tomaron colonias del cultivo de cianobacterias del Erlenmeyer de 50 mL y se colocaron dentro del mortero.
4. Luego se vertió nitrógeno líquido dentro del mortero e inmediatamente se maceró la muestra hasta realizar una lisis celular de las cianobacterias.
5. Rápidamente se traspasó la muestra a un tupo Eppendorf de 1.5 mL, se tapó y se etiquetó con el número de muestra (C1 y C2).
6. Dicho procedimiento se repitió para las muestras de los fotobiorreactores (C3 y C4).
7. Posteriormente se colocaron todos los tubos Eppendorf de 1.5 mL dentro del tubo Eppendorf de 50 mL. Se selló y se guardó en un sobre de papel craft para su envío por FedEx hacia MacroGen en Corea del Sur.

### **Solicitud de servicio 16s rRNA MacroGen Inc**

Dicho procedimiento se realizó con el apoyo del departamento de Ingeniería Química y la Universidad del Valle. Para lo cual, dicha solicitud se realizó por medio de la cuenta de MacroGen de dicha universidad.

### **Materiales y equipo**

- Computadora
- Muestras de cianobacterias por secuenciar

### **Procedimiento**

1. Se ingresó a la página de MacroGen Inc (MacroGen Online Sequencing Order system)
2. Se ingresó a “Order” y en “Identification” se seleccionó 16s rRNA.
3. Luego se seleccionó el tipo de muestra “Bacteria” y el modo de envío “Cell in glycerol”.

4. Luego se ingresó la cantidad de muestras a secuenciar: 4 muestras con nombre C1, C2, C3 y C4.
5. Y luego se llenó el formulario con la información solicitada de facturación y el correo para recibir los resultados de dicha secuenciación.
6. Se descargaron los documentos para llevar a FedEx (Carta emitida por MacroGen para solventar los gastos de envío y las ordenes de envío).
7. Se procedió a llevar las muestras y documentos a FedEx para su envío.

## **Análisis de resultados de secuenciación en NCBI-BLAST**

### **Materiales y equipo**

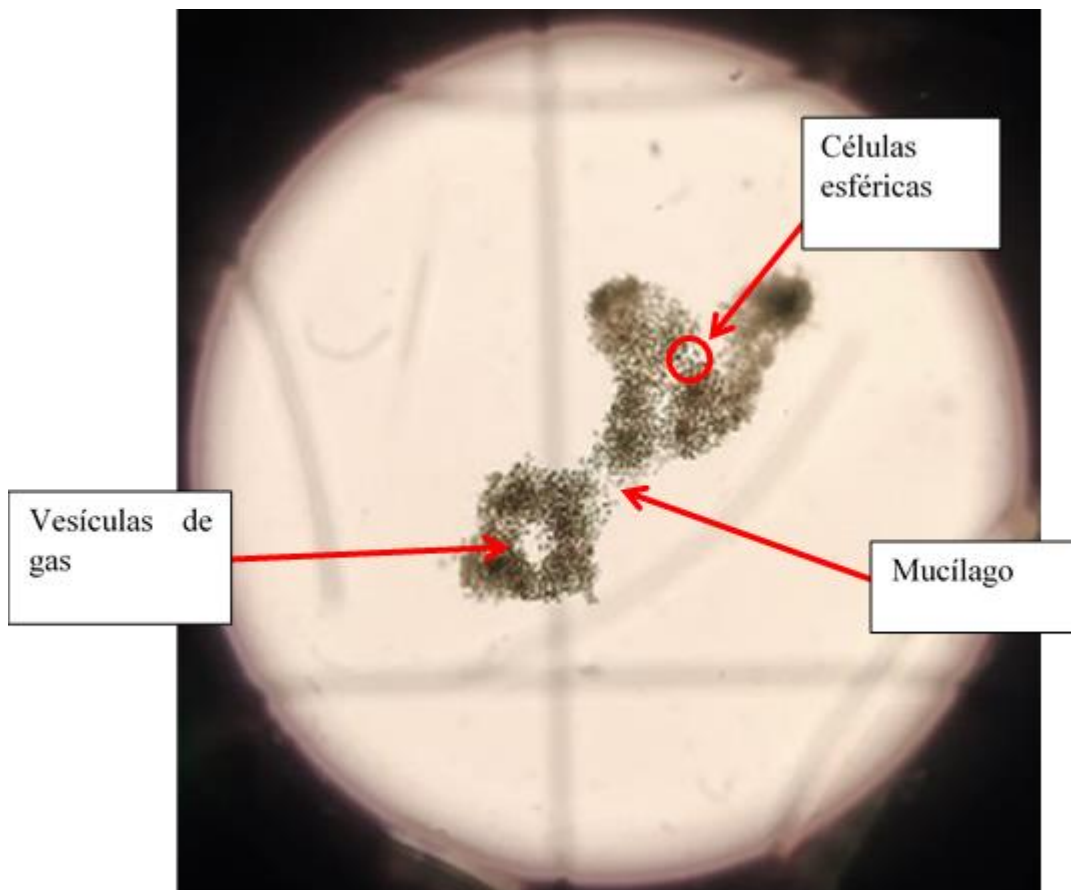
- Computadora
- Base de datos NCBI-BLAST (®)
- Resultados de secuenciación ARNr 16S

### **Procedimiento**

1. Se descargaron los documentos enviados por MacroGen al correo indicado.
2. Al ser documentos .zip, se procedió a descomprimir la carpeta.
3. En la carpeta de “blast result” se accedió al documento con la identificación de microorganismos.
4. Se ingresó en el enlace adjunto para cada microorganismo identificado para obtener la secuencia FASTA.
5. Se copió la secuencia FASTA.
6. Se ingresó al sistema de BLAST ®, y seleccionó la opción “Nucleotide BLAST” y se copió la secuencia FASTA en “Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)”.
7. Luego en la parte final de la página se seleccionó la opción “BLAST” y se esperó hasta terminado el análisis.
8. Y se tomaron los datos respectivos de identificación.

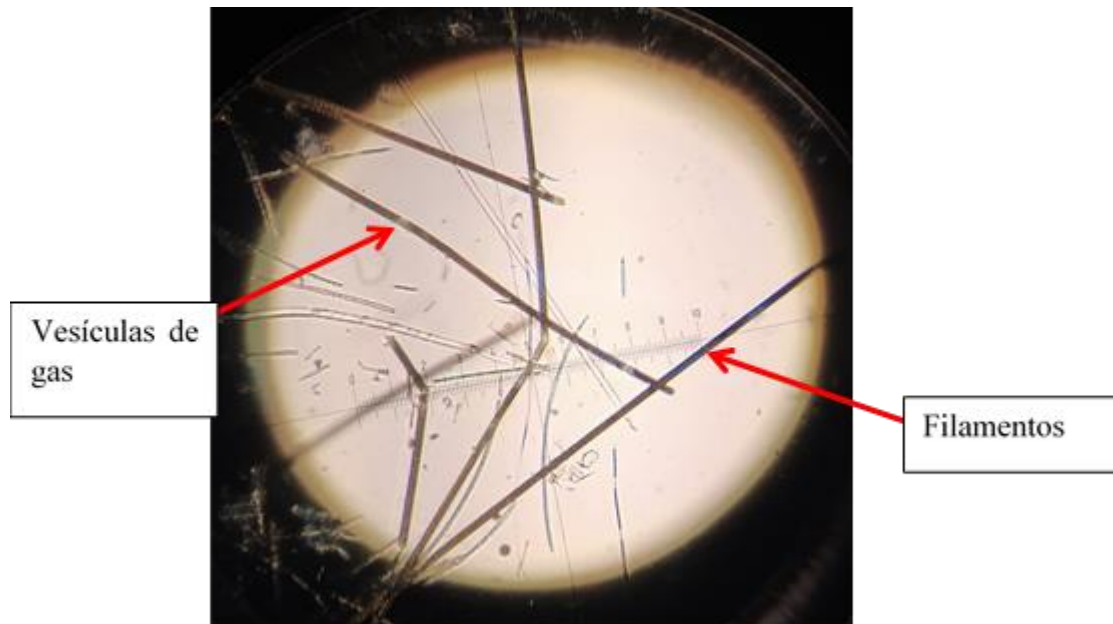
## VII. Resultados

**Figura 14.** Identificación de cepa de *Microcystis* en muestras de aguas recién obtenidas en agosto del lago de Atitlán con aumento de 40X



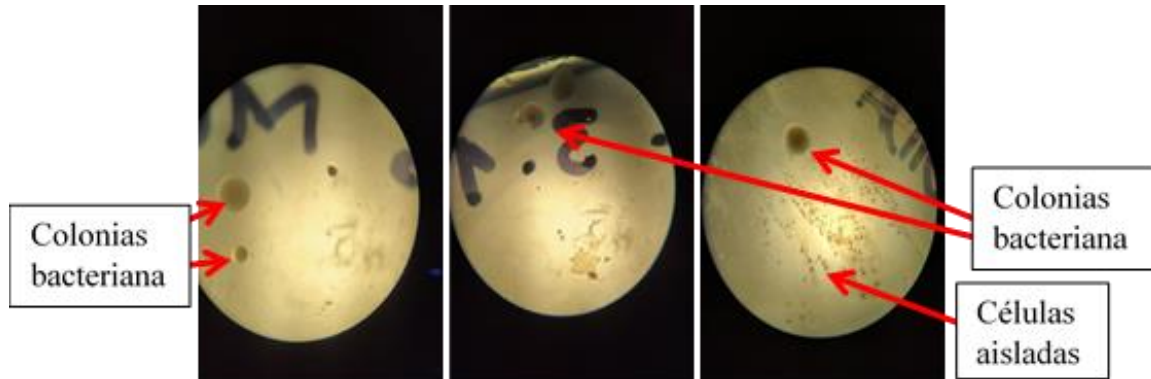
*Nota.* La figura muestra la identificación de una cepa de cianobacteria presente en el lago de Atitlán con aumento de 40X, dichas muestras fueron recolectadas en horas de la mañana y se tenían datos de florecimiento de cianobacterias durante la época de julio a agosto, se logró apreciar bajo el microscopio dos especies de cianobacteria, entre las cuales estaba *Microcystis* la cual se seleccionó para trabajar con ella y esta forma colonias agrupadas con presencia de mucílago, células con morfología circular y tonalidad verduzca oscura.

**Figura 15.** *Identificación de cepa Limnoraphis en muestras de agua recién obtenidas en agosto en el lago de Atitlán, con aumento de 40X*



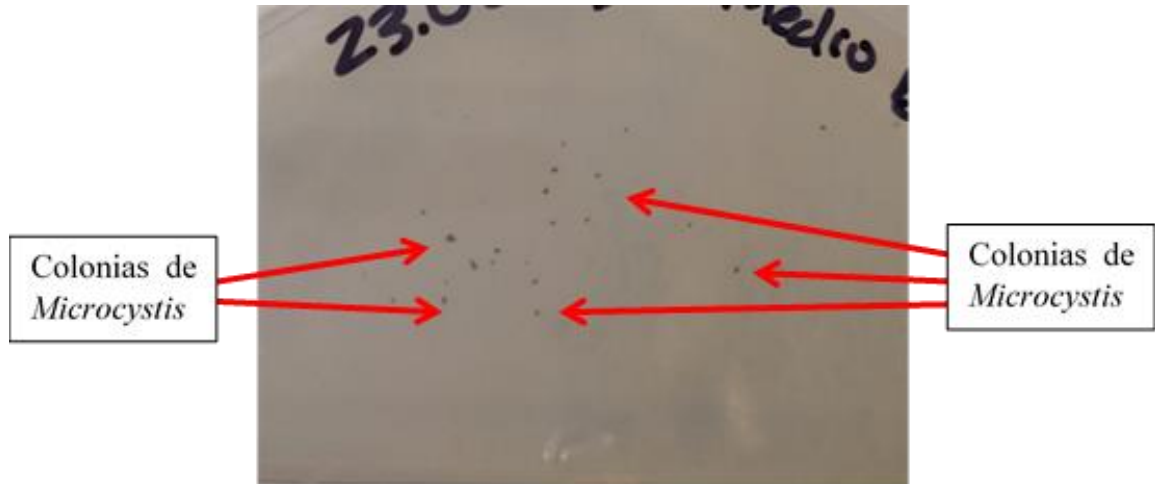
*Nota.* La figura muestra la identificación de una cepa de cianobacteria presente en el lago de Atitlán con aumento de 40X, dichas muestras fueron recolectadas en horas de la mañana y se tenían datos de florecimiento de cianobacterias durante la época de julio a agosto, se logró apreciar bajo el microscopio dos especies de cianobacteria, entre las cuales estaba *Limnoraphis robusta* la cual no se seleccionó para trabajar con ella por ser frágil a la manipulación para aislamiento. Esta cepa no forma colonias, su morfología es filamentosa y con una coloración verduzca y pardo-rojiza.

**Figura 16.** Crecimiento de colonias de cianobacterias y microalgas, resultados iniciales de la siembra en placas de Petri de muestras obtenidas en enero y marzo con aumento de 10X



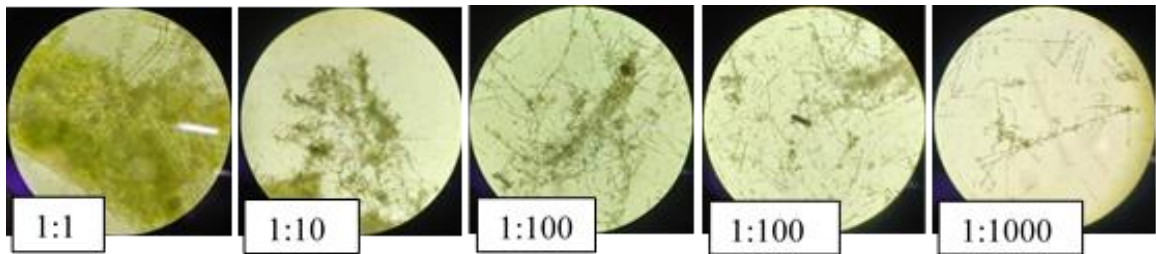
*Nota.* La figura muestra colonias de la siembra de muestras provenientes del lago de Atitlán del mes de enero y marzo bajo el microscopio estereoscopio con aumento de 10X incubadas por 30 días en placas de Petri, con el objeto de obtener colonias aisladas para proceder a el reconocimiento de una cepa específica de cianobacteria. Las colonias presentan un color amarillento oscuro y crecimiento escaso.

**Figura 17.** Crecimiento de colonias de *Microcystis* de la siembra en placas de Petri de muestras obtenidas en agosto



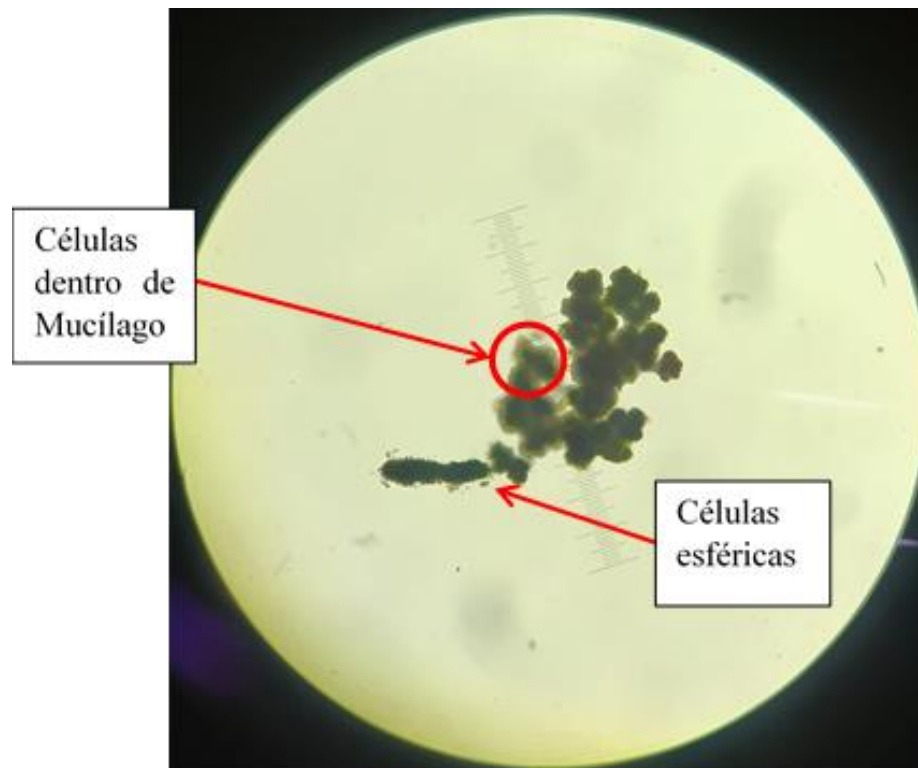
*Nota.* La figura muestra colonias de *Microcystis* de la siembra de muestras obtenidas en agosto del lago de Atitlán, incubadas por 22 días en placas de Petri, con el objeto de obtener colonias aisladas para proceder a el reconocimiento de una cepa específica de cianobacteria. Las colonias presentan una tonalidad verduzca oscura y crecimiento escaso, casi nulo.

**Figura 18.** *Microorganismos observados en las diluciones seriadas de las muestras de agua del lago de Atitlán en marzo, bajo microscopio*



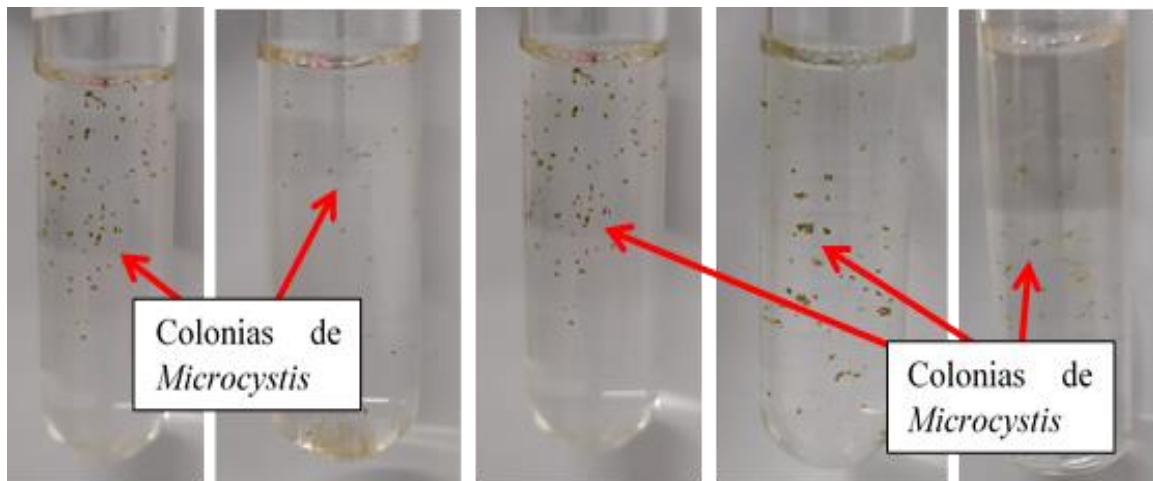
*Nota.* La figura muestra microorganismos de las diluciones seriadas de muestras obtenidas en marzo del lago de Atitlán, incubadas por 22 días en placas de Petri, con el objeto de obtener colonias aisladas para proceder al reconocimiento de una cepa específica de cianobacteria. Los microorganismos presentan una coloración verde claro y morfología variada. No se observa presencia de cianobacterias, solamente de microalgas y zooplancton.

**Figura 19.** Colonias de la cepa *Microcystis* identificadas en las muestras procesadas en el laboratorio en agosto, con aumento de 40X



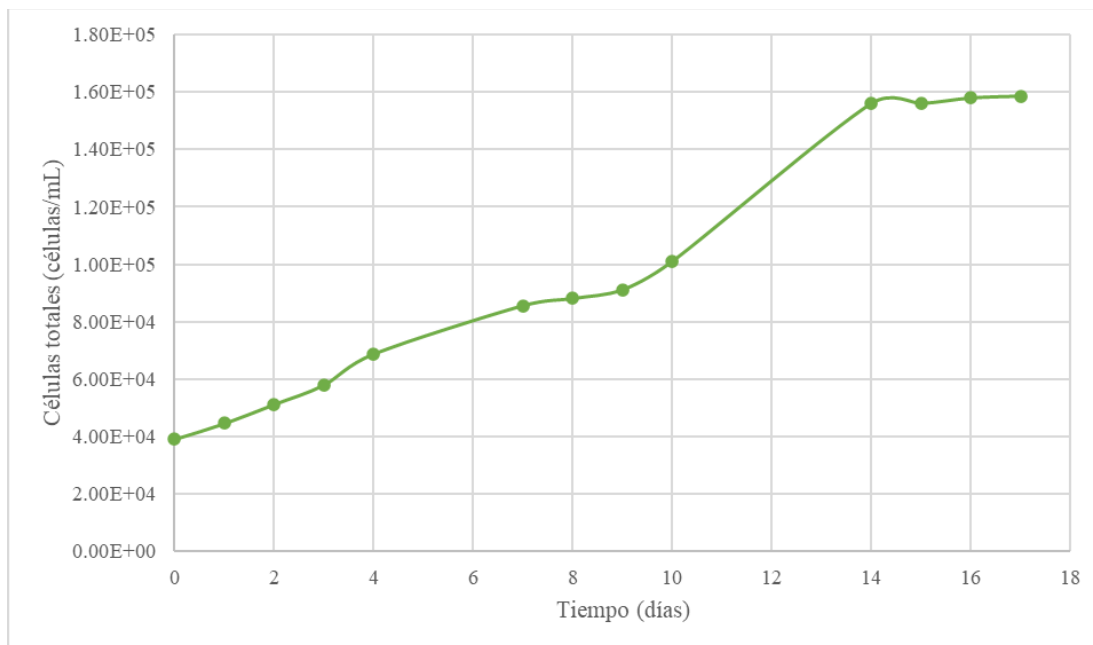
*Nota.* La figura muestra las colonias aisladas con pipetea Pasteur de las muestras de agua obtenidas en agosto del lago de Atitlán, bajo microscopio con aumento de 40x. Dichas colonias presentan células agrupadas con presencia de mucílago. Se observa una morfología circular y tonalidad verduzca oscura, representativa de *Microcystis*.

**Figura 20.** Aislamiento de colonias de *Microcystis* hacia tubos de ensayo de 5 mL con medio de cultivo BG11 formulado



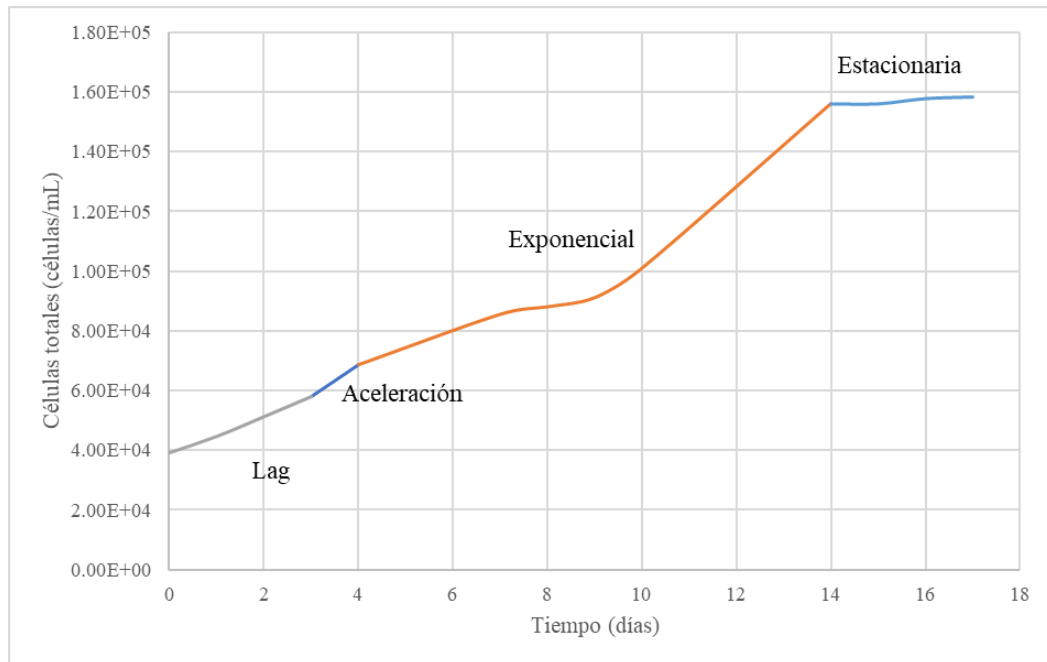
*Nota.* La figura muestra el aislamiento de colonias de *Microcystis* realizado con pipeta Pasteur en portaobjetos e identificadas bajo microscopio con objetivo 40x, trasladadas a 5 tubos de ensayo de 5 mL con medio de cultivo BG11 formulado. Se observan entre 30 a 50 colonias por tubo para lograr un crecimiento óptimo. La morfología y formación de colonias de la cepa de *Microcystis* que se aprecia a simple vista permite su facilidad de aislamiento.

**Figura 21.** Curva de crecimiento del cultivo de la cepa *Microcystis* en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL



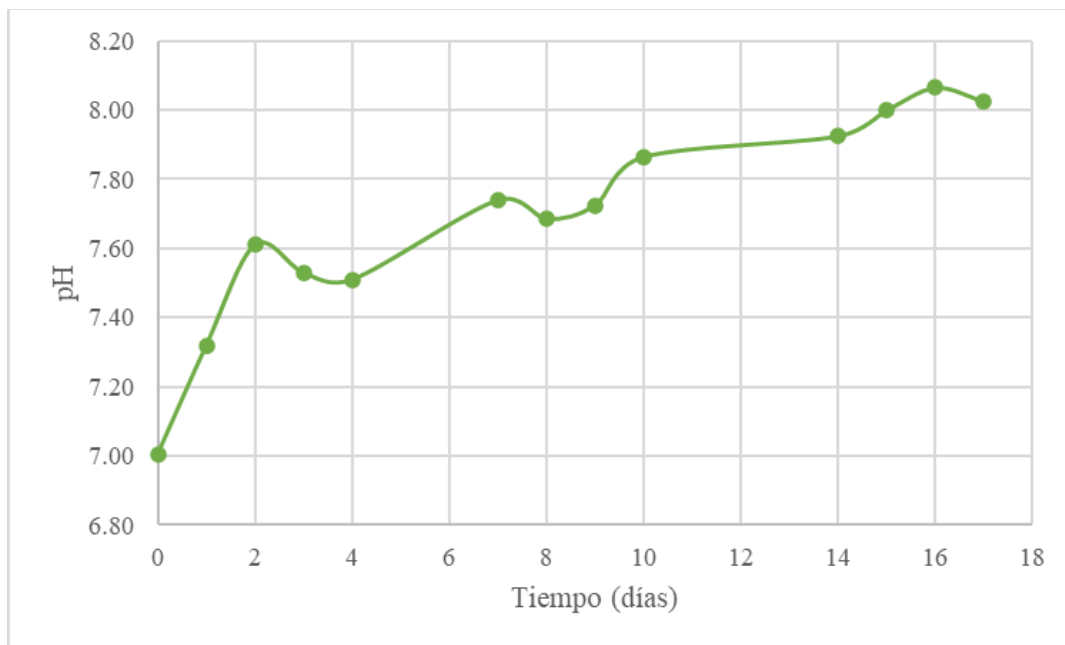
Nota. La figura muestra la curva de crecimiento del cultivo de la cepa *Microcystis* en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL con medio de cultivo BG11 Broth comercial. Experimentación realizada en duplicado por 22 días continuos, con una viabilidad promedio de  $98.87 \pm 0.005\%$ , un pH promedio de  $7.69 \pm 0.01$ , a una temperatura de  $19^\circ\text{C}$  y flujo de aire de  $0.4247 \text{ m}^3/\text{h}$ , con fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad. Equipo empleado para las mediciones: MUSE ®. Curva construida con datos de Cuadro 7.

**Figura 22.** Fases de la curva de crecimiento de la cepa *Microcystis* en fotobiorreactor de burbuja ascendente de 8,000 mL



*Nota.* Fases de la curva de crecimiento de la cepa *Microcystis* en fotobiorreactor de 8,000 mL con un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL con medio de cultivo BG11 Broth comercial. Experimentación realizada en duplicado por 22 días continuos, con una viabilidad promedio de  $98.87 \pm 0.005\%$ , un pH promedio de  $7.69 \pm 0.01$  y flujo de aire de  $0.4247 \text{ m}^3/\text{h}$ , a una temperatura de  $19^\circ\text{C}$ , con fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad. Equipo empleado para las mediciones: MUSE ®. Curva construida con datos de Cuadro 7.

**Figura 23.** Mediciones de pH del cultivo durante la fermentación de la cepa *Microcystis* en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL



*Nota.* Medición de pH del cultivo durante la fermentación de la cepa *Microcystis* en fotobiorreactores de 8,000 mL con un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL con medio de cultivo BG11 Broth comercial. Experimentación realizada en duplicado por 22 días continuos, con una viabilidad promedio de  $98.87 \pm 0.005\%$ , un pH promedio de  $7.69 \pm 0.01$ , a una temperatura de  $19^{\circ}\text{C}$  y flujo de aire de  $0.4247 \text{ m}^3/\text{h}$ , con fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad. Equipo empleado para las mediciones: PCSTestr 35 Multi Parameter. Curva construida con datos de Cuadro 7.

**Cuadro 4.** *Secuenciación del ADN de la cepa Microcystis de muestras de fotobiorreactores e inóculo inicial*

Muestra	Nombre Científico	Máx. puntaje	Puntaje total	% Identidad
C1	Clon de bacteria marina no cultivada Tc-42	2782	2782	100%
C2	Clon de bacteria marina no cultivada 155D1Bc4gj	1356	1356	100%
C3	Clon de bacteria marina no cultivada Tc-42	2782	2782	100%
C4	Bacteria marina W04	2780	2780	100%

*Nota.* Resultados de la secuenciación del ADN de la cepa *Microcystis* mediante el uso del método de secuenciación de ARNr 16S. Muestras obtenidas del cultivo en fotobiorreactores de burbuja ascendente e inóculos iniciales de la propagación de la cepa. C1 y C2: muestras del inóculo inicial de la cepa; C3 y C4: muestras del cultivo en fotobiorreactores de burbuja ascendente.

## VIII. Análisis de resultados

Para la presente investigación se tomaron muestras del lago de Atitlán en enero, marzo y agosto, en conjunto con el Centro de Estudios Atitlán (CEA) de la Universidad del Valle de Guatemala Campus Altiplano y AMSCLAE, para ello se consideraron las condiciones atmosféricas en el cuerpo de agua. Para agosto se apreció una notable floración de cianobacterias, con ayuda de la sonda RBRmaestro, se obtuvo una temperatura promedio del lago de Atitlán de  $22.42 \pm 1 * 10^{-7}^{\circ}\text{C}$ , y un pH promedio de  $6.55 \pm 1 * 10^{-7}$  (CEA, 2023), según Maynés (2018), la temperatura óptima para cianobacterias se encuentra entre  $20\text{-}24^{\circ}\text{C}$  y un pH entre 7 y 9. Por lo que dicha información confirmó la presencia de cianobacterias en el mes indicado y la funcionalidad de las muestras tomadas en comparación con enero y marzo, que presentaban temperaturas por debajo de los  $19 \pm 1 * 10^{-7}^{\circ}\text{C}$  (CEA, 2023).

Para cada toma de muestras en enero, marzo y agosto se realizó un análisis inicial de las cepas presentes. Las muestras se observaron bajo microscopio y se identificaron con base a su morfología y formación de colonias, para determinar las posibles cepas a aislar antes de su procesamiento en el laboratorio. Como se observa en la Figura 14, se logró identificar la cepa *Microcystis* ya que muestra células con morfología circular, presencia de mucílago y tonalidad verdusca oscura. Y como se muestra en la Figura 15, se identificó una segunda cepa de cianobacterias, conocida como *Limnoraphis*, que muestra una morfología filamentosa solitaria y con una coloración verdusca y pardo-rojiza. Dichas cepas han sido reportadas en estudios anteriores del lago de Atitlán, en donde se evidencia su presencia en forma de florecimientos en determinadas épocas del año (Cirés & Quesada, 2011) (CEA, 2023) (Mora *et al*, 2012).

Dicha identificación inicial permitió confirmar la viabilidad de las muestras tomadas para procesarlas en el laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala, Campus Central. En el proceso se evaluaron 3 técnicas microbiológicas para su aislamiento: aislamiento en placas de agar, diluciones seriadas y aislamiento con pipeta Pasteur, con el objeto de obtener un cultivo puro para su posterior propagación.

Como primera metodología, se evaluó el aislamiento en placas de agar para las muestras de agua obtenidas del lago de Atitlán en enero y marzo. Se observa en la Figura 16 los resultados de dicho procedimiento, en donde se evidencia la presencia de colonias de color amarillento oscuro y un crecimiento escaso, estas son las únicas cajas de Petri con crecimiento alguno de microorganismos. Sin embargo, no se observó presencia de cianobacterias ni formación de colonias de estas. Dicha metodología no fue adecuada debido a la escasa presencia de cianobacterias en las muestras obtenidas, y por la poca movilidad que brinda el medio hacia las cepas de interés; ya que en el caso de *Microcystis*, esta suele requerir flotabilidad para regular su posición en la columna de agua para obtener

los nutrientes necesarios, y en el caso de *Limnographis*, al ser una cepa en forma de filamento solitario, requiere de movilidad y es frágil a la manipulación, por lo que un estriado no es adecuado para su aislamiento, por lo que un medio de cultivo semisólido sería más adecuado (Cirés & Quesada, 2011) (Comas *et al*, 2017). Como se observa en la Figura 17, para las muestras de agosto, se apreció crecimiento de la cepa *Microcystis*, sin embargo, el crecimiento fue escaso, casi nulo, y al ser un medio sólido, no favoreció a su identificación ni producción de biomasa.

Como segunda metodología microbiológica, se evaluó el aislamiento con diluciones seriadas con las muestras de agua obtenidas del lago de Atitlán en marzo. En la Figura 18, se observa el crecimiento de los microorganismos en cada dilución seriada realizada, tales como microalgas y zooplancton. En cada dilución se observó que el conglomerado de microorganismos permanecía unido por mucílago, lo cual no permitió un aislamiento específico de una cepa. No se observó presencia de una cepa de cianobacteria de las observadas inicialmente en las muestras recolectadas del lago de Atitlán, lo cual se debe a la ausencia de un inóculo viable, suministro de nutrientes y microelementos abundante, y condiciones físico químicas inadecuadas (Chico, 2010) para las épocas de recolección de dichas muestras.

Con las muestras obtenidas en agosto y gracias a las condiciones atmosféricas del lago de Atitlán, con una temperatura promedio de  $22.42 \pm 1 * 10^{-7}^{\circ}\text{C}$ , y un pH promedio de  $6.55 \pm 1 * 10^{-7}$  (CEA, 2023), y evaluación visual de florecimientos, se confirmó la presencia de cianobacterias, específicamente de la cepa *Microcystis*. Al evaluar los resultados de las metodologías microbiológicas anteriores para aislamiento, se optó por evaluar la tercera metodología planteada: aislamiento con pipeta Pasteur, ya que dicha metodología es apta para separar fitopláctones mayores a  $10 \mu\text{m}$  de diámetro en forma de quistes, formas coloniales o filamentosas (Arredondo & Voltolina, 2010), y se fijó como objetivo aislar la cepa identificada en los florecimientos.

Como se observa en la Figura 19, en las muestras de agosto se aisló con pipeta Pasteur la cepa *Microcystis*, ya que se observaban a simple vista las formaciones superficiales de colonias representativas de dicha cepa, en donde la presencia de aerótopos permitió su flotabilidad (Gabito, 2019). Al observarlas bajo microscopio, se apreció el conglomerado de células con morfología esférica dentro de un mucílago, dicha cepa presentaba las características de cianobacterias del orden Chroococcales, las cuales suelen ser de formas unicelulares y coloniales envueltas en una capa mucilaginosa (Crettaz, 2018); con lo cual se confirma que la cepa identificada y aislada era de la familia *Microcystaceae* y del género *Microcystis*.

Con objetivo de lograr una confirmación a nivel genético de la cepa aislada, se secuenció el ADN de la cepa *Microcystis* con el método de secuenciación del ARNr 16S. Como se observa en el Cuadro 4, los resultados muestran la presencia de bacterias marinas y clones, al no tener una identificación específica de una cepa de cianobacterias, no es posible comparar con la identificación microscópica realizada. Esto se debe a una contaminación por cruzamiento de ADN al realizar el protocolo de extracción, y por otros microorganismos dentro del cultivo al ser muestras provenientes de un cuerpo de agua con gran carga bacteriana y la presencia de mucílago que alberga conglomerados tanto de

cianobacterias como algunas otras especies de algas y bacterias que presentan relaciones simbióticas (Arredondo & Voltolina, 2010). Por lo que se evidencia que el aislamiento de la cepa fue incompleto al presentar complicaciones con la extracción de ADN al tener presencia de mucílago, por lo que es recomendable la eliminación de la capa mucilaginosa para separar las células de *Microcystis* y evaluar nuevos otros protocolos de extracción y purificación de ADN genómico y presentar resultados más exactos para la identificación a nivel de genoma.

Asimismo, el aislamiento con pipeta Pasteur permitió observar la cepa bajo microscopio y trasladarla a tubos de ensayo de 5 mL con medio de cultivo BG11 para cianobacterias. Como se observa en la Figura 20, el aislamiento fue exitoso y se obtuvo con ello, inóculos para propagar la cepa a diferentes volúmenes de cultivo. Debido a una presencia limitada de la cepa *Microcystis* en las muestras obtenidas del lago de Atitlán, solo fue posible la adición de 30 a 50 colonias para lograr un crecimiento adecuado del cultivo y evitar inhibición del crecimiento por población baja.

En la Figura 29 se observa la propagación de la cepa *Microcystis* a diferentes escalas en medio de cultivo BG11 formulado y comercial. Para lo cual se realizó en duplicado el crecimiento con incubación por 22 días continuos para cada volumen, con el objetivo de escalar la cepa a un fotobiorreactor de burbuja ascendente de 8,000 mL para obtener un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL. Las condiciones de los cultivos fueron con fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad, temperatura de 19°C (temperatura de laboratorio) ya que con la lámpara roja tipo regleta se alcanzaba una temperatura entre 20 y 22°C, y el empleo de luz roja favorece el crecimiento de biomasa al aumentar la concentración y producción de ficobiliproteínas los cuales representan un 50% del total de las proteínas celulares de las cianobacterias, lo cual beneficia a la producción de biomasa; la temperatura empleada es cercana a la temperatura del lago de Atitlán, lo cual evitó un estrés en las cianobacterias por el cambio de condiciones y su transporte en frío, y se sabe que las temperaturas que permiten una tasa alta de crecimiento se encuentran en un rango de 22 a 30 °C (Vega & Rivera, 2022).

El escalado de la cepa hacia los fotobiorreactores desde los cultivos mostrados en figura 29, se realizó para obtener un inóculo adecuado, esto permitió analizar el crecimiento al utilizar curvas de crecimiento bacteriano para identificar las fases de retraso, exponencial y estacionaria. En la Figura 21, se observa la curva de crecimiento del cultivo de la cepa *Microcystis* en fotobiorreactores de burbuja ascendente. Esto Demuestra un aumento en las células totales en la suspensión evaluada. Con la toma de datos en el equipo MUSE®, se obtuvo una viabilidad promedio de  $98.87 \pm 0.005\%$  con una desviación estándar de  $0.83\% \pm 0.005\%$ , y se obtuvo el tiempo de generación de 8.47 días y una productividad de  $7.03 * 10^6$  células/L día. Lo cual evidencia un crecimiento lento de la cepa y producción de células por litro al día escaso en el periodo de tiempo evaluado, lo cual, al considerar las condiciones de crecimiento, se debió a las fluctuaciones en la incorporación del aire por acumulación en los difusores de aire lo cual no favorece a su posicionamiento en la columna de agua para captación de nutrientes y en procesos fotosintéticos de donde obtienen la mayor cantidad de energía; y cambios constantes en la temperatura del laboratorio (Chico, 2010). Por lo que se recomendaría realizar los cultivos bajo condiciones mayormente controladas para propiciar un aumento de la población de la cepa estudiada y lograr obtener

datos para realizar modelos cinéticos que permitan estandarizar el proceso de escalamiento industrial y con ello generar grandes cantidades de biomasa que puedan ser empleadas para sintetizar compuestos de beneficio industrial, como proteínas, ácidos grasos esenciales y vitaminas, lo cual se produce gracias a la presencia de polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados, terpenos, clorofila y pigmentos en las cianobacterias (Romero *et al*, 2017).

La Figura 22 presenta las fases del crecimiento de la cepa *Microcystis*, el cultivo se llevó a cabo durante 17 días por lo que no se llegó hasta la fase de muerte. Sin embargo, se demuestra que el mayor crecimiento se llevó a cabo durante los días 4 al 14, esto evidencia un consumo de nutrientes y realización de procesos de fijación de nitrógeno al realizar fotosíntesis que permitió identificar las fases de crecimiento. Se observa que la fase de retraso no duró mucho y se obtuvo una aceleración rápida hacia la fase exponencial, lo que evidencia una buena respuesta de crecimiento por parte de las cianobacterias hacia el medio de cultivo BG11, el cual es específico para microorganismos de agua dulce al ser carente de nitrógeno, por lo que las cianobacterias primero fijan nitrógeno atmosférico y luego realizan las actividades metabólicas (Ortega *et al*, 2023). Al día 14, se observó una desaceleración en la generación de células por litro al día, hasta llegar a la fase estacionaria, donde había presencia alta de cianobacterias, sin embargo, se analizó de forma cualitativa un crecimiento bajo de biomasa dentro del medio en los fotobiorreactores (Figura 30, Anexo), que nuevamente se vio afectado por la fluctuación en las condiciones de crecimiento.

En la Figura 23, se aprecia que, a lo largo del crecimiento de las cianobacterias en el medio evaluado, hubo aumento de pH desde el inicio hasta el final de las corridas, se observan picos en el día 2, 8 y 10. Se sabe que un aumento de pH es atribuido a la disminución de ácido carbónico, por lo que la forma más abundante de carbono inorgánico disuelto era bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) (Mora & Ruiz, 2012), lo cual puede limitar el crecimiento de las cianobacterias y pudo haber afectado el tiempo de generación y la productividad diaria del cultivo de dichos microorganismos. Sin embargo, no limitó por completo el crecimiento de las cianobacterias, y según Mora & Ruiz (2012) esto es debido a la presencia de la enzima anhidrasa carbónica en su composición. Por lo que se recomienda evaluar las concentraciones de bicarbonato adecuadas para el crecimiento óptimo de las cianobacterias.

Los cambios de pH observados que mantienen el medio en un pH neutro a ligeramente alcalino, indica que las cianobacterias secretan subproductos en respuesta a las reacciones metabólicas que realizan. Al tener conocimiento de la presencia de *Microcystis* en el medio, se sabe que es una cepa caracterizada por la producción de microcistinas, las cuales han sido de gran preocupación por su gran presencia en el lago de Atitlán, al ser toxinas que alteran las propiedades organolépticas del cuerpo de agua y su estado de salud, además de ser capaces de sobrevivir al ser estables y resistentes a la hidrólisis química u oxidación a pH casi neutro (Comba, 2009).

Sin embargo, el conocimiento de las propiedades de las toxinas secretadas por *Microcystis* presenta una opción para el estudio de su aplicación como aleloquímicos que pueden emplearse en el desarrollo comercial de compuestos que funcionen como insecticidas o alguicidas (Chico, 2010). El análisis de estos factores permite que la medición del pH de un cuerpo de agua y el monitoreo de los cambios de este, producto de

las interacciones de las cianobacterias, entre otras características mencionadas, se permita considerar a estos microorganismos aptos como indicadores de la calidad de las aguas, así como la concentración celular presente, ya que las densidades permitidas son menores a 20,000 células/mL (Comba, 2009) esto permite controlar las floraciones o anticiparlas en las épocas del año.

Finalmente, que el aporte al estudio e investigación de aislamiento y propagación de cianobacterias provenientes del lago de Atitlán en el área de ingeniería en biotecnología industrial busca brindar datos iniciales para sentar las bases de estudios de optimización de métodos de aislamiento y cultivos, procesos de propagación escalables, producción de metabolitos valiosos, y buscar la sostenibilidad y escalabilidad de microorganismos con mucho potencial industrial, tales como las cianobacterias, con los resultados obtenidos durante la experimentación.

## IX. Conclusiones

- Tras la evaluación de tres técnicas de aislamiento de cianobacterias, se observó que un aislamiento con pipeta Pasteur permite separar fitopláctones mayores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, como es el caso de la cepa *Microcystis*. Dicho procedimiento se facilitó debido a sus características morfológicas, con un cultivo puro para su propagación posterior.
- Se identificó una cepa de cianobacteria presente en el lago de Atitlán. Al observar bajo el microscopio la muestra en cuestión, fue posible definir que el microorganismo era del orden *Chroococcales*, de la familia *Microcystaceae* y del género *Microcystis*. Gracias a la morfología esférica de sus células con formas unicelulares y coloniales con presencia de mucílago y vesículas de gas (aerótopos) permite su flotabilidad en el medio de cultivo.
- La identificación de la cepa *Microcystis* (identificada por métodos microscópicos) con el método de secuenciación de ARNr 16S presentó complicaciones debido a la contaminación por otros microorganismos en el medio gracias a la carga bacteriana que presenta el lago de Atitlán y cruzamiento de ADN al realizar el protocolo de extracción de ADN. Con esto, se evidencia que el aislamiento de la cepa fue incompleto al presentar mucílago que alberga conglomerados de microorganismos.
- Fue posible la propagación de la cepa *Microcystis* en medio de cultivo líquido hasta escalar la fermentación a un fotobiorreactor de burbuja ascendente de 8,000 mL con volumen efectivo de 5,000 mL para el estudio de las fases de crecimiento. Se obtuvo una viabilidad promedio de  $98.87 \pm 0.005\%$ , una desviación estándar de  $0.83\% \pm 0.005\%$ , un tiempo de generación de 8.47 días y una productividad de  $7.03 * 10^6 \text{ células/L día}$ , lo cual evidenció un crecimiento lento y producción escasa de biomasa, pero una respuesta satisfactoria de las cianobacterias hacia el medio de cultivo líquido BG11 durante el cambio de la fase de retraso hacia la fase exponencial del crecimiento de *Microcystis*.

## **X. Recomendaciones**

- Para muestras con baja concentración de fitoplancton, se recomienda el empleo de técnicas de aislamiento combinadas, tales como diluciones seriadas y siembra de dichas diluciones directamente en medios de cultivo semisólidos para una mejora en la obtención de cultivos puros.
- Se recomienda mantener los cultivos en medio líquido BG11 durante la propagación bajo un sistema de condiciones controladas, para mantener los fotoperiodos más exactos, una temperatura controlada que propicie el crecimiento adecuado de cepas de cianobacteria y, si es posible, una agitación constante para mantener de forma homogénea el medio en donde crecen los microorganismos y no se formen biofilms que afecten su crecimiento con el fin de lograr una producción alta de biomasa.
- Para mejorar los resultados del método de secuenciación de ARNr 16S, se recomienda evaluar otros métodos para extracción y protocolos de purificación de ADNg, con el fin de evitar contaminaciones de las muestras o interferencias durante el análisis. Asimismo, se recomienda la eliminación del mucílago para obtener células separadas de la cepa de interés y obtener muestras puras para su secuenciación.
- Evaluar variaciones del medio de cultivo de cianobacterias, como cambio en concentración de bicarbonato, para presentar un comportamiento de crecimiento más acercado a las interacciones que se presentan en los cuerpos de agua naturales, por lo cual se recomienda realizar una cinética de crecimiento detallada y verificar la producción de subproductos, con el fin de escalar a nivel industrial dicho cultivo y evaluar sus aplicaciones dentro de la industria.
- Se recomienda ampliar los estudios enfocados al aprovechamiento de las microcistinas como aleloquímicos con lo cual se beneficie el desarrollo de insecticidas para cultivos que no generen tanta contaminación.

## XI. Referencias

- Aguilera, A. y Echenique, R. (2010). *Consideraciones generales de Cyanobacteria: aspectos ecológicos y taxonómicos*. Cap. 2 Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Universidad Nacional de La Plata. <https://core.ac.uk/download/pdf/301104148.pdf>
- Ajcalón, W; Francis, R. (2011). *La contaminación por cianobacterias del Lago de Atitlán*. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala. <https://biblioteca.medicina.usac.edu.gt/tesis/pre/2011/002.pdf>
- Arredondo, B. y Voltolina, D. (2010). *Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas*. Capítulo 1. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar (CICIMAR-IPN). Departamento de Placton y Ecología Marina. La Paz, Baja California Sur. México.
- Baján, N. (2016). *La contaminación del Lago de Atitlán, Guatemala, amenaza la subsistencia y la salud de los habitantes*. <https://globalpressjournal.com/americas/guatemala/contamination-of-guatemalas-lake-atitlan-threatens-livelihoods-health-of-residents/es/>
- CEA. (2023). Metadata RBRmaestro\_16\_Agosto\_2023. Monitoreo mes de agosto del 2023 del Lago de Atitlán (WG, SA, WP, SB). Centro de Estudios Atitlán. Universidad del Valle de Guatemala Campus Altiplano.
- Chico, F. (2010). Caracterización a nivel laboratorio de tres cianobacterias aisladas del área foliar de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta mediante clave microscópica, tiempo de generación... Universidad Central de Ecuador, Ecuador.
- Cirés, S; Quesada, A. (2011). *Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España. <https://www.sergas.es/Saude-publica/Documents/1477/CAT%C3%81LOGO%20CIRES%20QUESADA.pdf>
- Comas, A; Labaut, Y; Peraza, R. (2017). Ocurrencia de *Limnoraphis robusta* (Parakutty) Komárek et al. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) en el embalse Hanabanilla (Cuba Central). Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos, Cuba. [https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/39/PDF/39\\_2017\\_01.pdf](https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/39/PDF/39_2017_01.pdf)

- Comba, N. (2009). *Las cianobacterias como indicadores de la calidad del agua en el embalse de Betania (Cuencia Alta del Río Magdalena)*. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales. Bogotá, Colombia. <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/1213/T844.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gabito, L. (2019). Descripción y modelación de la presencia y crecimiento de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 (cianobacteria) en función de variables ambientales en la costa del Río de la Plata (Montevideo). Universidad de la República de Uruguay. Rocha, Uruguay. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/28617/1/uy24-19527.pdf>
- Grandez, M; Segundo, E; Rodríguez, H; Castro, C; Torres, M; Marapara, J; Castro, J; Cobos, M. (2021). *Aislamiento y caracterización molecular y bioquímica de una cianobacteria (Anabaena sp.) del río Amazonas, Loreto-Perú*. Revista ECIPerú. <https://revistaeciperu.com/wp-content/uploads/2021/06/reciperu202138Grandez.pdf>
- Guzmán, O; Ricaño, C; Luis, D; Ricaño, J. (2023). *NCBI: generalidades del repositorio y breve descripción de recursos aplicables al estudio de la fitogenética*. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 46 (1). México. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/46-1/7a.pdf>
- Llano, V; Meichtry, N; Tonon, S. (2005). *Método para el aislamiento y purificación de ADN de Microcystis spp.* Laboratorio de Plancton y Bentos, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNAM. Revista Científica Tecnológica. <https://www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt/index.php/recyt/article/view/644/570>
- Martínez, R. (2014). *Aislamiento y evaluación de la viabilidad de cianobacterias de la Rizósfera de plantas leguminosas cultivadas en la parroquia Poaló, Latacunga-Cotopaxi*. Repositorio de Tesis de Grado y Posgrado. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ecuador. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/9395>
- Maynés, C. (2018). *Cultivo de Cianobacterias en Aguas Residuales para la extracción de pigmentos*. Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental. Escola de Camins. UPC BarcelonaTech. Barcelona, España. [https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/127158/Mayn%c3%a9s\\_Carme\\_CultivoCianobacterias.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/127158/Mayn%c3%a9s_Carme_CultivoCianobacterias.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Millipore Sigma. (2016). *MUSE ® Cell Analyzer*. User Guide. [Archivo PDF]. Disponible en: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/instruments/muse/Muse%20Cell%20Analyzer%20-%200500-3115.pdf>
- Mora, P; Ruiz, S. (2012). *Actividad biocida y estudios de toxicidad de extractos de cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el Lago de Atitlán*. Facultad de

- Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3370.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3370.pdf)
- Morales, E; Rodríguez, M; García, D; Loreto, C; Marco, E. (2002). *Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria Anabaena sp. PCC 7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>*. Interciencia, vol. 27, núm. 7. Asociación Interciencia. Caracas, Venezuela. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33907007>
- Moreno, I. (2002). *Microcistinas: presencia, determinación y estudio toxicológicos*. Universidad de Sevilla. Sevilla, España. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=44194>
- NCBI. (2023). *Basic Local Alignment Search Tool*. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Ortega, Y; Gómez, L; Silveira, Y. (2023). *Desarrollo y caracterización de un consorcio de cianobacterias aislado de suelo rizosférico de Carica papaya*. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852023000200368](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852023000200368)
- Ortez, L; Dolores, M; Moran, L. (2022). Distribución espacio-temporal de cianobacterias planctónicas y factores ambientales asociados a sus proliferaciones en el embalse Cerrón Grande, El Salvador. Universidad Centroamericana José Simeón Cañas. El Salvador. DOI: <https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v70i1.47625>
- Pérez, J. (2018). *Cianobacteria en el Lago de Atitlán no llega a índices de alarma, aseguran autoridades locales*. <https://dca.gob.gt/noticias-guatemala-diario-centro-america/cianobacteria-en-el-lago-de-atitlan-no-llega-a-indices-de-alarma-aseguran-autoridades-locales/>
- Pérez, L. (2003). *Caracterización de las secuencias ribosomales 16s (ADNr) de cianobacterias asociadas a eventos de toxicidad*. Programa de Estudios de Posgrado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C. [https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/505/1/perez\\_j.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/505/1/perez_j.pdf)
- Ramírez, L; Queiroz, L; Jacob, E; (2013). *Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias*. Ciencia y Tecnología. UTEQ. Quevedo-Ecuador. <https://revistas.uteq.edu.ec/index.php/cyt/article/view/132/146>
- Rejmánková, E; Korárek, J; Dix, M; Komárková, J; Girón, N. (2010). *Cyanobacterial blooms in Lake Atitlan Guatemala*. Limnologica, ELSEVIER. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0075951110000800>
- Rodicio, M; Mendoza, M. (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*.

Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. <https://n9.cl/r0ah8>

Romero, L; Guevara, M; Gómez, B; Arredondo, B; Cortez, R; Licet, B. (2017). *Producción de pigmentos procedentes de Arthospira máxima cultivada en fotobiorreactores*. Revista Colombiana de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77652900013.pdf>

Roset, J; Aguayo, S; Muñoz, M. (2001). *Detección de cianobacterias y sus toxinas*. Revista de Toxicología, vol. 18, núm. 2. Asociación Española de Toxicología. Pamplona, España.

Van, A; LeVeque, R; Martin, N; DiRita, V. (2024). *Curvas de crecimiento: Generación de curvas de crecimiento utilizando unidades formadoras de colonias y mediciones de densidad óptica*. Departamento de Microbiología y Genética Molecular. Universidad Estatal de Michigan. Michigan, Estados Unidos. <https://www.jove.com/es/v/10511/growth-curves-cfu-and-optical-density-measurements?language=Spanish#:~:text=Una%20curva%20de%20crecimiento%20t%C3%ADpica,estacionaria%20y%20fase%20de%20muerte.>

Vega, N; Rivera, C. (2022). *Análisis bibliométrico del efecto de la luz en la producción de ficobiliproteínas*. Instituto Tecnológico Metroponitano. <https://www.redalyc.org/journal/3442/344271354011/html/>

## XII. Anexos

### A. Datos originales

**Cuadro 5.** *Primera corrida de crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con medio de cultivo líquido BG11 Broth*

Fecha	No. de muestra	Día de fermentación (días)	Células totales ( $\pm 0.005 \cdot 10^n$ células/mL) (1)	Células viables ( $\pm 0.005 \cdot 10^n$ células/mL) (1)	Viabilidad ( $\pm 0.005$ %)	pH
27/11/2023	0	0	3.87E+04	3.82E+04	97.40%	7.09
28/11/2023	1	1	4.64E+04	4.58E+04	98.70%	7.38
29/11/2023	2	2	5.92E+04	5.74E+04	97.10%	7.54
30/11/2023	3	3	6.84E+04	6.77E+04	99.00%	7.55
4/12/2023	4	4	7.80E+04	7.68E+04	98.40%	7.61
5/12/2023	5	7	9.19E+04	9.12E+04	99.30%	7.86
6/12/2023	6	8	9.05E+04	8.94E+04	98.80%	7.75
7/12/2023	7	9	9.14E+04	9.06E+04	99.10%	7.83
8/12/2023	8	10	1.01E+05	1.01E+05	99.20%	7.84
11/12/2023	9	14	1.55E+05	1.53E+05	99.30%	7.90
12/12/2023	10	15	1.56E+05	1.55E+05	99.50%	8.01
13/12/2023	11	16	1.58E+05	1.57E+05	99.50%	8.10
14/12/2023	12	17	1.59E+05	1.59E+05	100.00%	8.06

*Nota.* El cuadro muestra la primera corrida de la experimentación en el transcurso del tiempo con su respectivo pH. El crecimiento de las cianobacterias se realizó durante 17 días continuos en un fotobiorreactor de burbuja ascendente de 8,000 mL, con un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL y un flujo de aire de  $0.4247 \text{ m}^3/\text{h}$ . Se empleó el medio de cultivo líquido BG11 Broth comercial sin alterar. Equipo empleado para analizar los valores: MUSE®.

**Cuadro 6.** *Segunda corrida de crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con medio de cultivo líquido BG11 Broth*

Fecha	No. de muestra	Día de fermentación (días)	Células totales ( $\pm 0.005 \cdot 10^n$ células/mL) (2)	Células viables ( $\pm 0.005 \cdot 10^n$ células/mL) (2)	Viabilidad ( $\pm 0.005$ %)	pH
27/11/2023	0	0	3.95E+04	3.94E+04	99.60%	6.92
28/11/2023	1	1	4.28E+04	4.12E+04	96.30%	7.26
29/11/2023	2	2	4.33E+04	4.20E+04	97.00%	7.68
30/11/2023	3	3	4.76E+04	4.68E+04	98.30%	7.51
4/12/2023	4	4	5.96E+04	5.87E+04	98.50%	7.41
5/12/2023	5	7	7.94E+04	7.91E+04	99.60%	7.62
6/12/2023	6	8	8.58E+04	8.50E+04	99.00%	7.62
7/12/2023	7	9	9.10E+04	9.07E+04	99.50%	7.62
8/12/2023	8	10	1.01E+05	1.01E+05	99.30%	7.89

## Continuación Cuadro 6

11/12/2023	9	14	1.57E+05	1.55E+05	99.30%	7.95
12/12/2023	10	15	1.57E+05	1.56E+05	99.50%	7.99
13/12/2023	11	16	1.58E+05	1.57E+05	99.50%	8.03
14/12/2023	12	17	1.58E+05	1.58E+05	99.90%	7.99

*Nota.* El cuadro muestra la primera corrida de la experimentación en el transcurso del tiempo con su respectivo pH. El crecimiento de las cianobacterias se realizó durante 17 días continuos en un fotobiorreactor de burbuja ascendente de 8,000 mL, con un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL y un flujo de aire de  $0.4247 \text{ m}^3/\text{h}$ . Se empleó el medio de cultivo líquido BG11 Broth comercial sin alterar. Equipo empleado para analizar los valores: MUSE®

## B. Datos calculados

**Cuadro 7.** Promedio de las corridas de crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL con medio de cultivo líquido BG11 Broth

Fecha	No. de muestra	Día de fermentación (días)	Células totales promedio (células/mL)	Células viables promedio (células/mL)	Viabilidad promedio (%)	pH
27/11/2023	0	0	3.91E+04	3.88E+04	98.50%	7.01
28/11/2023	1	1	4.46E+04	4.35E+04	97.50%	7.32
29/11/2023	2	2	5.13E+04	4.97E+04	97.05%	7.61
30/11/2023	3	3	5.80E+04	5.73E+04	98.65%	7.53
4/12/2023	4	4	6.88E+04	6.78E+04	98.45%	7.51
5/12/2023	5	7	8.57E+04	8.52E+04	99.45%	7.74
6/12/2023	6	8	8.82E+04	8.72E+04	98.90%	7.69
7/12/2023	7	9	9.12E+04	9.07E+04	99.30%	7.73
8/12/2023	8	10	1.01E+05	1.01E+05	99.25%	7.87
11/12/2023	9	14	1.56E+05	1.54E+05	99.30%	7.93
12/12/2023	10	15	1.56E+05	1.55E+05	99.50%	8.00
13/12/2023	11	16	1.58E+05	1.57E+05	99.50%	8.07
14/12/2023	12	17	1.59E+05	1.59E+05	99.95%	8.03
<b>Promedio</b>					<b>98.87%</b>	<b>7.69</b>
<b>Desviación</b>					<b>0.83%</b>	<b>0.30</b>

*Nota.* El cuadro muestra el promedio de las corridas realizadas durante la experimentación en el transcurso del tiempo con su respectivo pH. El crecimiento de las cianobacterias se realizó durante 17 días continuos en un fotobiorreactor de burbuja ascendente de 8,000 mL, con un volumen efectivo de reacción de 5,000 mL y un flujo de aire de  $0.4247 \text{ m}^3/\text{h}$ . Se empleó el medio de cultivo líquido BG11 Broth comercial sin alterar. Equipo empleado para analizar los valores: MUSE®

### C. Cálculo de muestra

**Cálculo 1.** *Determinación de la masa de un reactivo para la preparación de una solución a una molaridad específica*

$$M * PM = \text{Gramos de reactivo}$$
$$0.01M * \frac{39.997 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} = 0.39997 \text{ g NaOH}$$

$M = \text{molaridad requerida}$   
 $PM = \text{Peso molecular del reactivo}$

**Cálculo 2.** *Promedio de una serie de datos*

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{N}$$
$$\frac{(3.87 * 10^4 + 3.95 * 10^4) \text{ células/mL}}{2} = 3.91 * 10^4 \text{ células/mL}$$

$\bar{X} = \text{promedio}$

$X_N = \text{muestras analizadas}$

$N = \text{cantidad de muestras analizadas}$

**Cálculo 3.** *Desviación estándar para una muestra*

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum |X_N - \bar{X}|^2}{N - 1}}$$
$$\sqrt{\frac{|7.01 - 7.69|^2 + |7.32 - 7.69|^2 + \dots + |8.03 - 7.69|^2}{13 - 1}} = 0.30$$

$\sigma = \text{desviación estándar}$

$X_N = \text{muestras analizadas}$

$\bar{X} = \text{promedio}$

$N = \text{cantidad de muestras}$

\*El cálculo se realizó con el promedio de las mediciones de pH para las dos corridas realizadas.

#### Cálculo 4. Tiempo de generación

$$\frac{t_b - t_B}{\frac{\ln(b) - \ln(B)}{\ln(2)}} = \text{Tiempo de generación}$$
$$\frac{14 - 4}{\frac{\ln(1.56 * 10^5) - \ln(6.88 * 10^4)}{\ln(2)}} = 8.47 \text{ días}$$

$t_b$  = día en donde termina la fase exponencial del crecimiento celular

$t_B$  = día en el que inicia la fase exponencial del crecimiento celular

$b$  = concentración celular en el tiempo  $t_b$

$B$  = concentración celular en el tiempo  $t_B$

#### Cálculo 5. Productividad

$$\frac{\Delta \text{Concentración celular}}{\Delta \text{Tiempo}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \text{Productividad}$$
$$\frac{(1.59 * 10^5 - 3.91 * 10^4) \text{ células/mL}}{(17 - 0)} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 7.03 * 10^6 \text{ células/L día}$$

\*El cálculo se realizó con los cambios de concentración celular y tiempo desde el día 0 de la fermentación, hasta el punto más alto en la curva de crecimiento celular.

#### D. Fotografías

**Figura 24.** Red de Nanoplancton con porosidad de 25um para recolección de muestras en el lago de Atitlán



**Figura 25.** *Recolección de muestras de agua del lago de Atilán en monitoreos en conjunto con el Centro de Estudios Atilán (CEA) y AMSCLAE. Fecha: 17 de enero, Hora: 09:35*



**Figura 26.** *Red de Nanoplankton con porosidad de 10  $\mu$ m para concentración de muestras del lago de Atilán*



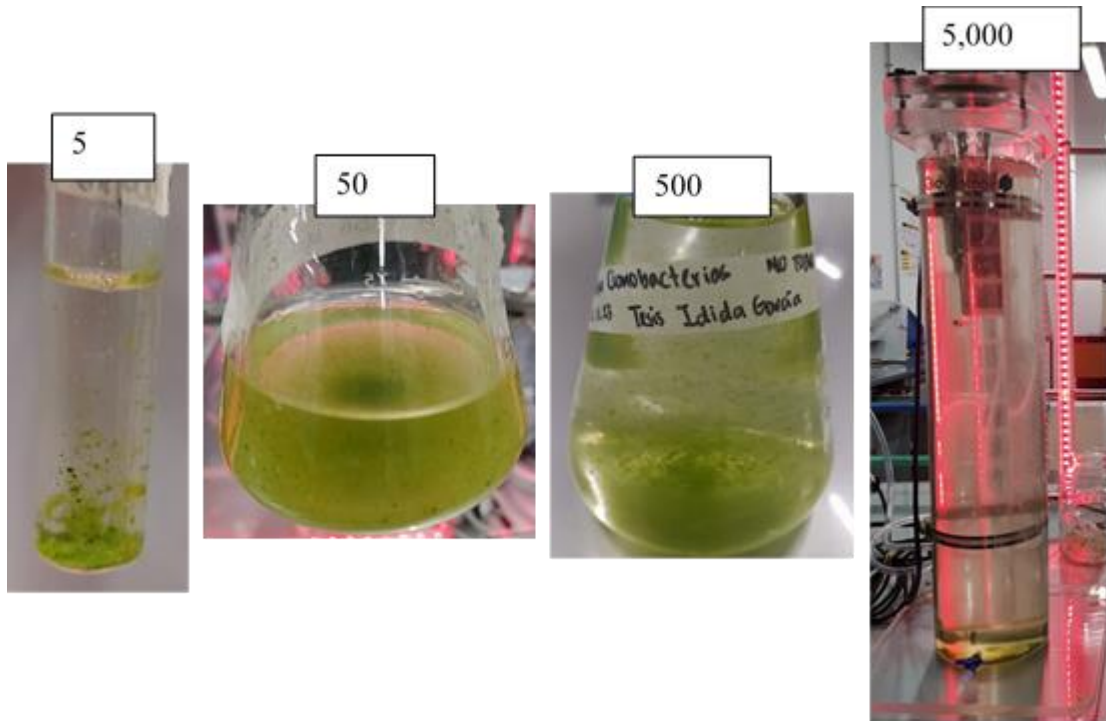
**Figura 27.** Sistema de incubación para crecimiento con condiciones controladas (temperatura 22°C, fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad) con tira de luz roja led en el laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala



**Figura 28.** Sistema de incubación para crecimiento con condiciones controladas (temperatura 22°C, fotoperiodos 12:12 horas luz-oscuridad) con luz roja tipo regleta, en el laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala



**Figura 29.** Propagación de la cepa *Microcystis* a diferentes escalas: 5, 50, 500 y 5,000 mL en medio de cultivo BG11 formulado y comercial



**Figura 30.** Crecimiento de la cepa *Microcystis* en medio de cultivo BG11 Broth comercial en fotobiorreactores de burbuja ascendente de 8,000 mL en el laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala

