

## BIOPROSPECCIÓN DE MACROCOLONIAS DE NOSTOC SP. EN LOS ANDES ECUATORIANOS

### Bioprospecting study of *Nostoc* sp. macrocolonies in the Ecuadorian Andes

Mabel CADENA<sup>1</sup>, Denisse MOLINA<sup>2</sup>, Ana CARVAJAL<sup>1</sup>,  
Diana ONTANEDA<sup>2</sup> y Ever MORALES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias  
de la Vida, Ingeniería en Biotecnología, Sangolquí- Ecuador

<sup>2</sup>Centro de Biología-Universidad Central del Ecuador

<sup>3</sup>Proyecto Prometeo y Secretaría de Educación Superior  
Ciencia Tecnología e Innovación (SENESCYT)

evermster@gmail.com

### RESUMEN

Se realizó un estudio sobre bioprospección de la cianobacteria *Nostoc* en los Andes ecuatorianos, la cual fue recolectada en el Parque Nacional Cayambe-Coca, páramo de Papallacta, parroquia Cevallos, Tungurahua y Pintag, Pichincha. Se realizaron análisis morfológicos, detección de pigmentos liposolubles, capacidad de tolerancia a la desecación, aislamiento y crecimiento en cultivos discontinuos. Se identificaron 6 morfotipos, el verrugoso verde y negro fue el más abundante, seguido del globoso y granular-gelatinoso. El mayor contenido de clorofila *a* se obtuvo en el verrugoso negro (25,5 µg/ml) y verrugoso verde (24 µg/ml), mientras que los carotenoides se acumulan más en el amorfo-gelatinoso (10,5 µg/ml). El morfotipo verrugoso verde aislado en medio sólido demostró capacidad de crecimiento hasta cultivos de un litro con medio BG11<sub>0</sub>. Esta cianobacteria aerofítica fijadora de nitrógeno, con tolerancia a la sequía y a limitación de nutrientes, constituye un recurso biológico valioso para estudios fisiocológicos y para la producción de biomasa de interés en biotecnología.

**Palabras clave:** Bioprospección, cianobacteria, Ecuador, morfotipo, *Nostoc*

### ABSTRACT

A study on bioprospection of the cyanobacteria *Nostoc* in the Ecuadorian Andes, collected in the Cayambe-Coca National Park, paramo of Papallacta town, Cevallos, and Pintag-Pichincha was performed. Morphological analysis, detection of soluble pigments, ability of desiccation tolerance, isolation and growth in batch cultures were realized. Six morphotypes were identified, the green and the black warty were the most abundant, followed by globose-granular and gelatinous morphotypes. The highest content of chlorophyll *a* was obtained in black warty (25.5 µg/ml) and green warty (24 µg/ml), while carotenoids accumulated more in the gelatinous (10.5 µg/ml). The warty green morphotype isolated on solid medium showed growth capacity to one liter culture BG11<sub>0</sub> medium. This nitrogen fixing aerophytic cyanobacteria, with tolerance to drought and nutrient limitation is a valuable biological resource for ecological physiology studies, and for the production of biomass of interest in biotechnology.

**Keywords:** Bioprospecting, cyanobacteria, Ecuador, morphotype, *Nostoc*

## INTRODUCCIÓN

Los estudios de bioprospección con cianobacterias como recursos biológicos para la producción de biofertilizantes, pigmentos y exopolisacáridos son de interés científico ya que pueden generar información sobre biodiversidad, taxonomía, bioquímica, nutrición y biotecnología de cultivos de estos microorganismos fotosintéticos (Castree 2003; Morales *et al.* 2013). Las cianobacterias constituyen una alternativa innovadora para ser utilizadas como células productoras de biomasa enriquecida con proteínas, exopolisacáridos y metabolitos secundarios de interés farmacológico (Naranjo *et al.* 2010).

La búsqueda de cianobacterias en diferentes ambientes húmedos, acuáticos, termófilos, nevados, terrestres o salinos conlleva a identificar microambientes colonizados por cepas adaptadas a estos hábitats y de interés económico. Tal es el caso de la cianobacteria *Nostoc*, con una amplia distribución tanto en sistemas acuáticos como en terrestres y tolerancia a ambientes extremos de temperatura, deshidratación, limitación de nutrientes, incluyendo las regiones polares, aguas termales, páramos, zonas de desglaciación y desiertos (Quian *et al.* 1989; Herdman *et al.* 2001; Nemergut *et al.* 2007).

Actualmente en Chile, China, Francia, Italia, Japón y Venezuela, entre otros países, se ha investigado la fisiología, bioquímica, calidad nutricional, variedad de componentes farmacéuticos y la producción de biomasa de alta calidad que ofrece la cianobacteria *Nostoc*. Estos estudios han demostrado que *Nostoc* es una fuente proteica importante, y con varios usos alimenticios tanto fresca como deshidratada. Aunque numerosas cepas de *Nostoc* han sido identificadas, solo unas pocas especies se han caracterizado en detalle (Herdman *et al.* 2001; Otero & Vincenzini 2004; Rosales 2007).

Diversas especies de *Nostoc* han sido empleadas en la dieta humana desde hace 2000 años, por poblaciones en Asia donde utilizaban *N. commune* Vaucher ex Bornet & Flahault para sobrevivir durante la hambruna y *N. flagelliforme* Komárek desde hace 400 años para tratar la diarrea, la hipertensión y la hepatitis (Danxiang *et al.* 2004). En China, esta cianobacteria continúa siendo utilizada como complemento alimenticio, no obstante, la tasa de crecimiento anual de *Nostoc flagelliforme* en su ambiente natural es demasiado lenta (Dai 1972). El incremento a la demanda de consumo de *Nostoc flagelliforme* está causando un posible peligro de extinción y un evidente deterioro del ambiente (Gao 1998). Por lo tanto, se han visto en la necesidad de cultivar *N. flagelliforme* en condiciones de laboratorio para satisfacer la demanda en el mercado y conservar esta especie. Esto es un ejemplo de la importancia de estudiar esta cianobacteria, más aun en aquellos países donde la consumen.

En las comunidades andinas de Perú, Chile y Bolivia se consume *Nostoc punctiforme* Hariot y *Nostoc verrucosum* Vaucher ex Bornet & Flahault como alimento, lo cual representa un recurso nutricional y constituye parte importante de la cultura andina alimentaria y de sus tradiciones festivas (Arenas 2009). En Perú,

los indígenas denominan a *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault y *Nostoc commune* como cushuro, murmunta, llayta, yoyo o luche (Aldave-Pajares 1969; Pulgar 1987; Villagrán *et al.* 2003) y los consumen sobre todo en épocas de lluvia, cuando se los encuentra en mayor abundancia.

En Ecuador, a pesar de que *Nostoc* crece en muchos de sus páramos o en altitudes sobre los 2000 m snm, aún no se tienen descritas investigaciones sobre bioprospección para producción de biomasa, ni para estudios de taxonomía, calidad nutricional o de los beneficios que puede aportar a la salud humana o animal. Por tal motivo, el presente estudio tiene como objetivo la caracterización morfológica de diferentes morfotipos de *Nostoc* identificados en el Parque Nacional Cayambe-Coca del páramo de Papallacta y en un sector de la parroquia de Pintag, ambos de la provincia de Pichincha, así como el aislamiento de la cepa de *Nostoc*, a partir de un morfotipo al cual se lo denominó verrugoso verde, y procedente de Papallacta. Además, se analiza la capacidad de crecimiento en condiciones de laboratorio en cultivos sólidos y escalamiento en cultivos discontinuos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolecta de muestras de *Nostoc* sp.

Los muestreos se realizaron en las siguientes localidades:

Parque Nacional Cayambe-Coca, situado en el páramo de la parroquia Papallacta, 00°22'10" S, 81°15'67" O, entre 3200-4025 m snm. Carretero a la laguna de Loreto y de la curva de la Virgen. Temperatura media 14°C.

Parroquia de Pintag, provincia de Pichincha-Ecuador, situada 0°30'20" S, 78°30'15" O, entre 2800-2910 m snm. Temperatura media 13,6°C.

Parroquia Cevallos-Totoras, provincia de Tungurahua-Ecuador, a 1°21'16,52" S, 78°36'56,84" E, 2984 m snm. Temperatura media 14,5°C.

Las recolectas de *Nostoc* sp. se efectuaron en sustrato terrestre, crecidas a orillas de la carretera y sobre el césped o incluidas entre los musgos y rocas húmedas, de los cuales cinco se efectuaron en el páramo de Papallacta, dos en la parroquia de Pintag y dos en la de Cevallos-Totoras. Se tomaron datos de las características morfológicas externas y sobre su abundancia (toma de peso) y frecuencia de acuerdo a la época del año, en los meses de junio, julio, agosto de 2012, mayo 2013 (meses con elevadas precipitaciones) y noviembre 2012 (mes con bajas precipitaciones).

### Evaluación de las características morfológicas, humedad y medidas celulares

Las diferentes colonias recolectadas de acuerdo a su asociación con el sustrato se caracterizaron considerando la textura, coloración, talla, aspecto, morfología a nivel de microscopía óptica y patrón de crecimiento (Gao 1998; Otero & Vincenzini 2003; Yu *et al.* 2008). Para determinar el porcentaje de humedad se limpiaron y pesaron todos los morfotipos, luego se colocaron en estufa a 70°C o hasta obtener un peso constante (Arredondo & Voltolina 2007).

Se determinaron variables morfométricas tales como el diámetro de los heterocistos y de las células vegetativas, utilizando un microscopio marca ZEISS y una cámara Axio Cam MRC-ZEISS, mediante el programa Axio Vision LE-ZEISS. Para la identificación de la especie de la cepa de *Nostoc* se utilizó la clave taxonómica de Geitler (1932).

### **Determinación de pigmentos liposolubles**

Se pesaron 5 g de cada uno de los morfotipos recolectados, luego cada muestra fue dispersada empleando un homogenizador y posteriormente, 2 ml de cada muestra fueron colocados en un tubo Falcon para ser centrifugados a 5000 rpm por 10 min. Después, el sedimento fue resuspendido en 2 ml de metanol al 90% y congelado por 24 h. Seguidamente, después de descongelar y centrifugar las muestras, se leyeron las absorbancias de los extractos metanólicos en un espectrofotómetro a 480 y 665 nm para carotenoides y clorofila *a*, respectivamente (Marker 1972; Britton 1985; Morales 2012). Se realizó el cálculo mediante las ecuaciones propuestas por Marker *et al.* (1980) para clorofila *a* y por Strickland & Parsons (1972) para carotenoides.

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) = [(13,14 \times A_{665}) \times \text{vol. extracto}] / \text{vol. muestra}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/ml}) = [(A_{480} \times 4) \times \text{vol. extracto}] / \text{vol. muestra}$$

### **Selección de morfotipo para estudios de cultivo en condiciones de laboratorio**

La selección del morfotipo se basó de acuerdo a la cantidad recolectada, a su frecuencia en todos los muestreos, a las condiciones en las que se encontraban las macrocolonias, y a la facilidad de desprendimiento de los filamentos de las macrocolonias, utilizando un homogenizador.

### **Prueba de tolerancia a la desecación de *Nostoc* sp.**

La biomasa del morfotipo recolectado de *Nostoc* sp. al cual se le denominó verrugoso verde recolectado del Parque Cayambe-Coca, páramo de Papallacta se secó en estufa a 70°C, almacenado a temperatura ambiente entre 18-22°C en un envase hermético y en total oscuridad durante dos meses. La muestra se hidrató en 100 ml de medio BG11 y con aireación en frasco Erlenmeyer. A través de observación microscópica cada 3 días se evaluó su crecimiento mediante evidencia de desarrollo de tricomas, presencia de heterocistos y cobertura de colonias con vainas mucilaginosas (Kato *et al.* 2003).

### **Aislamiento, cultivo y escalamiento de la cepa de *Nostoc* sp. (morfotipo verrugoso verde)**

Una vez trasladadas las muestras al laboratorio se descartaron piedras, material vegetal, y luego se lavaron con agua destilada estéril, para ser colocadas en frascos de vidrio con medio de cultivo BG11 (Rippka *et al.* 1979) y en presencia

de iluminación continua ( $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Las muestras se observaron al microscopio con la finalidad de determinar la presencia de otras cianobacterias, microalgas e incluso de protozoarios.

Para el aislamiento, se homogenizó 0,5 g de biomasa del morfotipo verrugoso verde con 4 ml de medio BG11c (completo = con nitrógeno); luego, la biomasa resuspendida se sembró en medio BG11<sub>0</sub> (sin nitrógeno) sólido al 2%. Las cápsulas de Petri inoculadas se mantuvieron a un fotoperiodo 12:12 h con una densidad de flujo fotónico de  $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ .

El aislamiento fue logrado hasta obtener colonias libres de hongos, protozoarios, microalgas y de otras cianobacterias. Una vez aislada la cianobacteria se procedió a sembrar en BG11<sub>0</sub>, y BG11c (completo) diluido a un 25%, ambos medios sólidos en agar al 1%, 1,5% y 2%.

El cultivo en medio líquido por triplicado se inició a partir de las colonias de *Nostoc* sp., aisladas previamente en medio sólido, con un volumen de 25 ml de medio BG11c, BG11c con 25% de nutrientes y BG11<sub>0</sub> a pH 8 y mantenidos con agitación a 160 rpm, fotoperiodo 12:12 h, con una densidad de flujo fotónico de  $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y en frascos Erlenmeyers de 250 ml de capacidad. Al cultivo se le fue incrementado el respectivo medio BG11, a medida que los filamentos de la cianobacteria fueron desarrollándose y produciendo más biomasa, como indicador de crecimiento, hasta completar un volumen de 1000 ml de cultivo.

Los tricomas del morfotipo verrugoso-verde en cultivos discontinuos con medio BG11c y BG11<sub>0</sub> fueron evaluados para la detección cualitativa de exopolisacáridos capsulares (PSC), de acuerdo al método de tinción negativa con tinta china (Otero & Vicenzini 2004).

## RESULTADOS

### Morfotipos de macrocolonias de *Nostoc* sp.

En los dos sitios muestreados del páramo de Papallacta se identificaron seis morfotipos del género *Nostoc*: esférico-gelatinoso (I), amorfo-gelatinoso (II), verrugoso verde (III), verrugoso negro (IV), globoso (V), granuloso-gelatinoso (VI). Se describen las características morfológicas de estas macrocolonias en cuanto a color, forma, tamaño, textura; así también se detalla el sitio de recolecta y localidad provincial (Tabla 1).

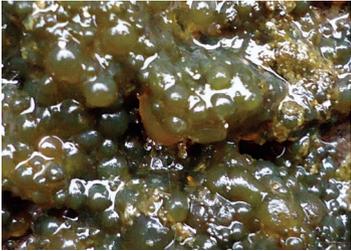
De estos tipos morfológicos de macrocolonias el verrugoso negro (IV) fue observado en Pintag, mientras que el esférico-gelatinoso (I) y el granuloso-gelatinoso (VI) se encontraron en zona rocosa y muy húmeda de la parroquia Cevallos, Barrio Totoras, provincia de Tungurahua (Tabla 2). La abundancia y frecuencia de todos estos morfotipos varió con el régimen de lluvias durante los cinco muestreos realizados entre junio del 2012 y mayo del 2013.

El morfotipo de *Nostoc* sp. denominado verrugoso Pintag (IV<sup>1</sup>) fue el más abundante en las localidades de Pintag, provincia de Pichincha y en la carretera de la curva de La Virgen-Parque Nacional Coca-Cayambe, provincia de Napo. En

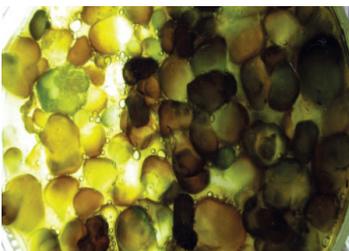
Pintag, provincia de Pichincha, se llegó a recolectar la mayor cantidad de biomasa durante todo el estudio realizado, con 11,34 y 10,5 kg en el primer y segundo muestreo, respectivamente. En cambio, los morfotipos más hidratados como el granular Totoras (I-V), globoso (V) y el granulado-gelatinoso (VI), fueron colonias gelatinosas muy hidratadas, de los cuales solo se recolectó biomasa húmeda de unos 0,2 g, 0,54 y 0,16 g, respectivamente.

Los morfotipos con mayor humedad fueron I, II, III, V y VI, con porcentajes entre 91 y 95%, siendo el menos hidratado el morfotipo verrugoso negro (IV) con un 71%, debido a que está más expuesto a la luz solar y está presente en períodos de sequía (Tablas 1, 2).

**Tabla 1.** Características de los diferentes morfotipos de *Nostoc* sp. observados en tres localidades de los Andes ecuatorianos.

Morfotipo	Características de las macrocolonias
Esférico-gelatinoso (I) 	Forma: esférica-amorfa. Tamaño: 0,04 -1,2 cm Textura: gelatinosa. Sitio: superficie rocosa en caliza, con una corriente constante de agua. Localidad: Parque Cayambe-Coca/páramo de Papallacta-Napo. Humedad: > 95%
Amorfo-gelatinoso (II) 	Forma: amorfa e irregular. Tamaño: 3-5 cm Textura: viscosa gelatinosa. Sitio: zona con gran acumulación de agua, sobre superficie rocosa húmeda y entre vegetación. Localidad: Parque Cayambe-Coca. Páramo de Papallacta-Napo. Humedad: > 95%
Verrugoso verde (III) 	Forma: espiralada y talo irregularmente enrollado. Tamaño: 1-8 × 1-1,5 cm Textura: informe, verrugosa-gelatinosa y áspera en época sin precipitaciones. Sitio: entre el césped y briofitas. Localidad: Parque Cayambe-Coca/páramo de Papallacta-Napo. Humedad: ~ 91%

**Tabla 1.** Continuación.

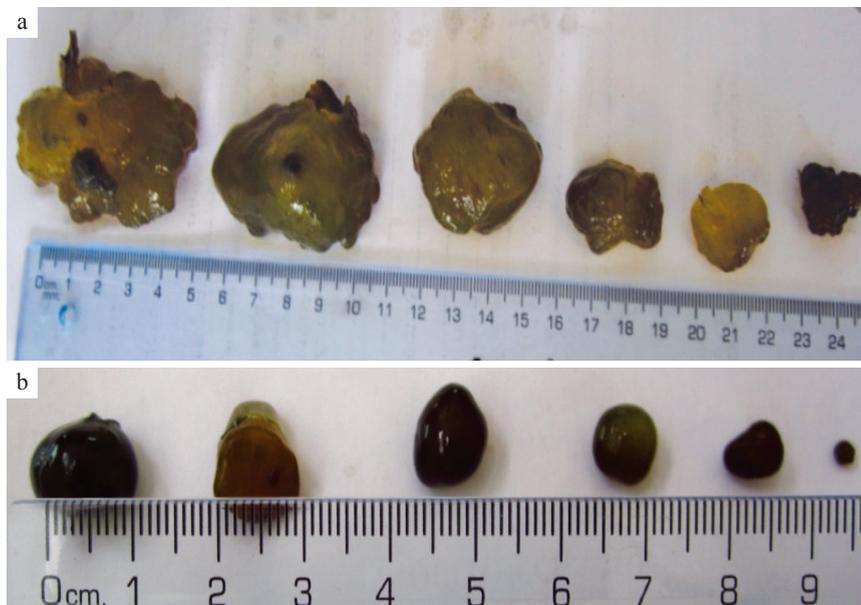
Morfotipo	Características de las macrocolonias
<p data-bbox="157 244 344 272">Verrugoso negro (IV)</p> 	<p data-bbox="536 244 873 272">Forma: acintada, espiralada e irregular.</p> <p data-bbox="536 274 745 302">Tamaño: 1-7 × 0,5-1 cm</p> <p data-bbox="536 303 953 348">Textura: verrugosa-gelatinosa y áspera en época de sequía.</p> <p data-bbox="536 350 994 455">Sitio: superficie del suelo entre piedras y poca vegetación y a orillas del carretero. Alcanza extensas áreas de coberturas a ambas orillas de la carretera del sector Curva de La Virgen.</p> <p data-bbox="536 457 977 502">Localidad: Parque Cayambe-Coca, carretero de La Virgen/ páramo de Papallacta-Napo.</p> <p data-bbox="536 503 691 531">Humedad: ~ 78%</p>
<p data-bbox="157 541 268 569">Globoso (V)</p> 	<p data-bbox="536 541 765 569">Forma: ovalada e informe.</p> <p data-bbox="536 571 762 599">Tamaño: 2-5,5 × 1-2,5 cm</p> <p data-bbox="536 601 956 645">Textura: gelatinosa, a veces con espacios huecos en el interior de la macrocolonia.</p> <p data-bbox="536 647 977 708">Sitio: entre piedras, vegetación y superficie rocosa, a orillas del carretero.</p> <p data-bbox="536 710 932 754">Localidad: Parque Cayambe-Coca/páramo de Papallacta-Napo.</p> <p data-bbox="536 756 691 784">Humedad: ~ 95%</p>
<p data-bbox="157 839 389 867">Granulado-gelatinoso (VI)</p> 	<p data-bbox="536 839 677 867">Forma: esférica.</p> <p data-bbox="536 868 753 897">Diámetro: 0,02 × 1,5 cm.</p> <p data-bbox="536 898 847 926">Textura: gelatinosa. Peridermis lisa.</p> <p data-bbox="536 928 977 989">Sitio: entre piedras, vegetación y superficie rocosa, a orillas del carretero.</p> <p data-bbox="536 991 906 1035">Localidad: Parque Cayambe-Coca/páramo de Papallacta-Napo.</p> <p data-bbox="536 1037 691 1065">Humedad: &gt; 95%</p>

**Tabla 2.** Características de los morfotipos de *Nostoc* sp. observados en las parroquias de Pintag, Pichincha y de Cevallos-Barrio Totoras, Tungurahua-Ecuador.

Morfotipo	Características de las macrocolonias
Verrugoso Pintag (IV <sup>1</sup> ) 	Forma: acintada-espiralada e irregular. Tamaño: 1-7 × 0,5-1 cm Textura: verrugosa-semigelatinosa y áspera en época de sequía. Área de coberturas: 6-20 m aprox. Sitio: superficie del suelo entre piedras y poca vegetación. Localidad: parroquia de Pintag/provincia de Pichincha. Humedad: ~ 94%
Granular Totoras (I-VI) 	Forma: gránulos amorfos. Tamaño: 0,5-1 × 1,5-3 cm Textura: gelatinosa. Sitio: superficie rocosa en caliza, con una corriente constante de agua. Localidad: parroquia Cevallos-Barrio Totoras/provincia de Tungurahua. Humedad: ~ 95%

El tamaño de las colonias globosas y granulares-gelatinosas se midieron en función de las diferentes tallas encontradas en sectores del Parque Cayambe-páramo de Papallacta (Fig. 1), con abundante población de estos dos morfotipos, de los cuales el morfotipo V y VI presentaron tallas de entre 2-5,5 × 1-2,5 cm y de 0,02 × 1,5 cm, respectivamente.

Los caracteres morfológicos macroscópicos de cada morfotipo en cuanto a color, textura, forma de la macrocolonia, y los caracteres microscópicos de las células vegetativas y de los heterocistos se describen en la Tabla 3. Se registra una diversidad en cuanto a la pigmentación desde verde oliva, marrón, pardo, hasta verde negruzco. En cambio, la textura que prevalece en los morfotipos es la gelatinosa en período de lluvia y con relación a la forma, la tendencia general es la globosa esférica en las macrocolonias hidratadas hasta la acintada-espiralada observada en las expuestas a pérdida de agua en época de sequía.



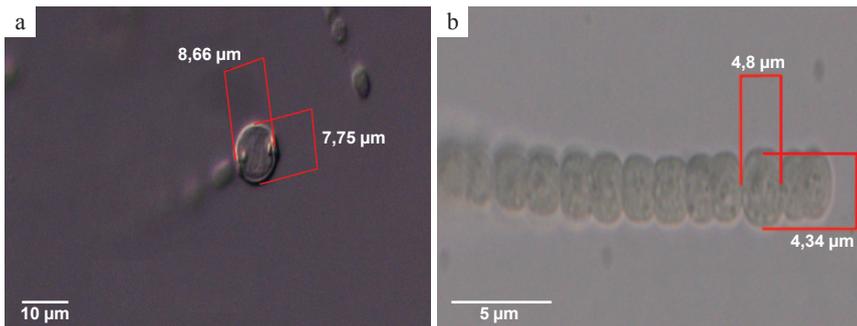
**Fig. 1.** Diferentes tallas de macrocolonias de *Nostoc* sp. recolectadas en Papallacta. **a.** Morfotipo globoso (V). **b.** Morfotipo granular-gelatinoso (VI).

**Tabla 3.** Caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos de seis morfotipos de colonias de *Nostoc* sp. identificadas en los Andes ecuatorianos.

Morfotipo	Color	Forma de células vegetativas*	Forma de los heterocistos*
I	verde oliva	barril-esférica	esférico
II	pardo verdoso a marrón	barril-cilíndrica	oval
III	pardo verdoso a marrón	barril-esférica	esférico
IV	negro	Íd.	Íd.
V	verde	Íd.	Íd.
VI	verde claro, oscuro, oliva, marrón	Íd.	Íd.
IV <sup>1</sup>	verde negruzco	Íd.	Íd.
I-VI	verde oliva	esférica-cilíndrica	Íd.

\*Observaciones microscópicas. IV<sup>1</sup> = morfotipo Pintag. I-VI = morfotipo Cevallos-Totoras. Íd. = ídem

La observación al microscopio de las formas de las células vegetativas y heterocistos en cambio fue más homogénea, prevaleciendo células en forma de barril a esférica y las esféricas en los heterocistos. Para el caso del morfotipo verrugoso verde se hicieron 10 mediciones de células vegetativas y 10 de heterocistos en 10 organismos. Se obtuvo una media de 4,48  $\mu\text{m}$  de ancho y de 4,8  $\mu\text{m}$  de largo para la célula vegetativa y de 7,5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 8,67  $\mu\text{m}$  de largo para el heterocisto, en cultivo discontinuo con medio BG11 (Fig. 2).



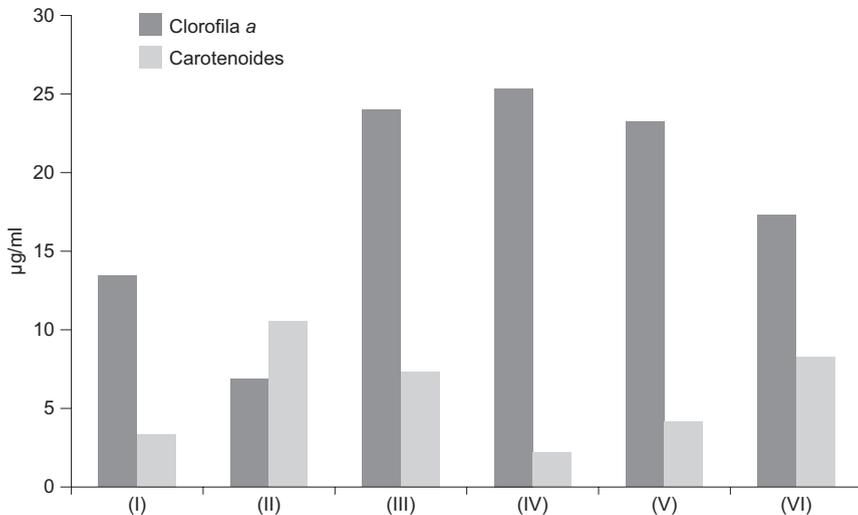
**Fig. 2.** Medida de células del tricoma de *Nostoc* sp. cultivado en laboratorio (morfotipo verrugoso verde), en cultivo discontinuo con medio BG11<sub>0</sub>. **a.** Heterocisto. **b.** Célula vegetativa.

### **Determinación de pigmentos liposolubles de los morfotipos de *Nostoc* sp. recolectados en el Parque Cayambe-Coca (provincia de Napo)**

El mayor valor de clorofila *a* se obtuvo en los morfotipos verrugosos (III y IV) y globoso (V) con valores entre 23-26  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que el de carotenoides fueron más altos en los morfotipos amorfo-gelatinoso (II) y granular-gelatinoso (VI) con valores de 11 y 8  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. El morfotipo verrugoso negro, a pesar de ser el más deshidratado y persistir a elevada irradiancia solar y sequía, presentó el mayor valor de clorofila *a* y el menor de carotenoides (Fig. 3).

### **Selección de morfotipo para estudios de cultivo en condiciones de laboratorio**

De acuerdo a las condiciones plantadas para la selección del morfotipo, se obtuvo que los morfotipos encontrados en mayor cantidad y en mejores condiciones fueron el verrugoso verde, globoso y el granular-gelatinoso, descartándose los morfotipos verrugoso negro, esférico-gelatinoso y amorfo-gelatinoso, finalmente el morfotipo del cual se pudieron desprender totalmente y con mayor facilidad los filamentos de la macrocolonia fue el verrugoso verde, siendo éste el elegido para las pruebas de cultivo en condiciones de laboratorio.



**Fig. 3.** Contenido de clorofila *a* y carotenoides ( $\mu\text{g/ml}$ ) en morfotipos de *Nostoc* sp. identificados en el Parque Cayambe-Coca, páramo de Papallacta-Ecuador.

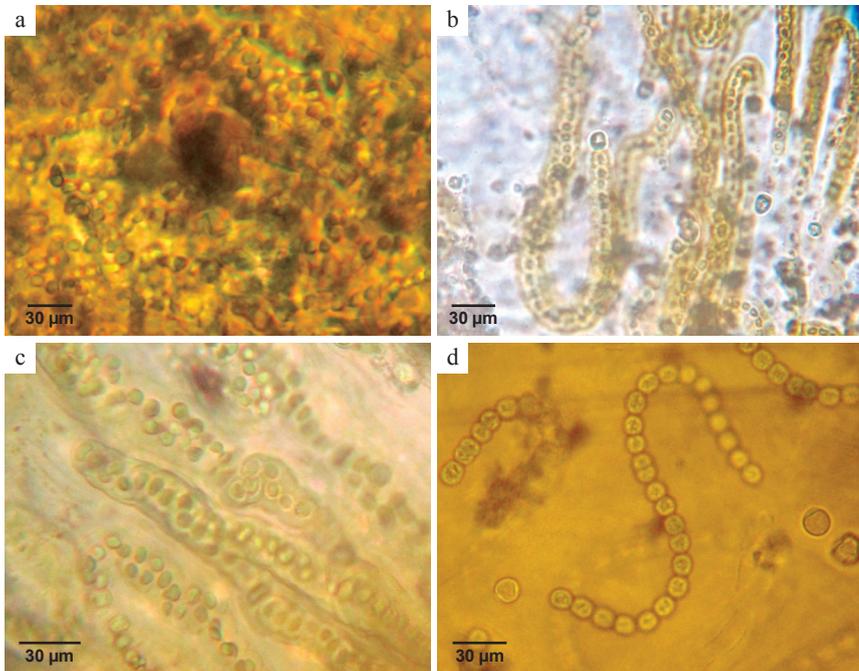
### Prueba de tolerancia a la desecación de *Nostoc* sp. (morfotipo verrugoso verde)

En la prueba de tolerancia a la desecación demostró una gran capacidad de rehidratación y reviviscencia después de ser sometida a desecación en estufa y mantenida herméticamente guardada durante dos meses en condiciones de laboratorio. A una hora de haber sido sumergidas en medio de cultivo se observó que las colonias pasaban de ser ásperas a suaves y gelatinosas nuevamente.

A las 24 h comenzaron a observarse al microscopio pequeñas esferas de color verde amarillento, lo que indica que ya había comenzado el proceso de reviviscencia. Además, se aprecia una vaina mucilaginosa incipiente que recubre las células vegetativas y los heterocistos. A partir del décimo día se observó una total recuperación de su morfología, ya que las células vegetativas retoman la pigmentación verde claro, indicativo de que las células vegetativas reinician la actividad fotosintética. La presencia de heterocistos y células vegetativas totalmente envueltas en la vaina mucilaginosa, característica de colonias viables, se observó a las 24 h de haber sido hidratada (Fig. 4).

### Aislamiento y cultivo de la cepa de *Nostoc* sp. (morfotipo verrugoso verde)

La cepa de *Nostoc* sp. procedente del morfotipo verrugoso verde creció entre los 8 y 10 días después de sembrada en medio sólido. Las colonias al crecer fueron grumosas de color verde muy oscuro. Al observar al microscopio se notó la presencia de *Anabaena* sp., *Leptolyngbya* sp., y *Chlorella* sp. Finalmente y des-

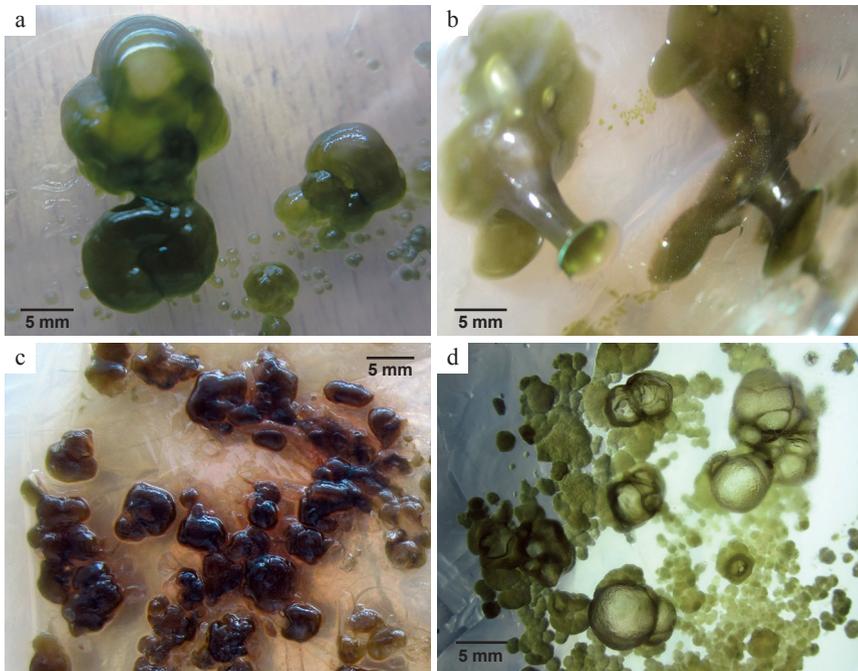


**Fig. 4.** Prueba de tolerancia a la desecación de *Nostoc* sp. **a.** *Nostoc* sp. después de 1 h de hidratación, se observan células vegetativas de color verdusco. **b.** *Nostoc* sp. luego de 24 h de hidratación, se observa a las células vegetativas recubiertas por vaina mucilaginosa. **c.** *Nostoc* sp. a los 10 días de hidratación. **d.** *Nostoc* sp. a los 15 días de hidratación.

pués de realizar varias re-siembras en medio sólido con BG11<sub>0</sub> se logró la eliminación de estas cianobacterias y microalga.

Se observaron colonias gelatinosas de color verde y marrón, con forma circular, globosa o verrugosa, con una variación del crecimiento y morfología según la consistencia del agar (Fig. 5). Al 1% se apreciaron colonias globosas y gelatinosas de color verde claro, crecidas en medio BG11<sub>0</sub> y colonias gelatinosas de color marrón en BG11 al 25%. Cuando se inocularon muestras de *Nostoc* sp. en agar al 1,5% en medio BG11<sub>0</sub>, se desarrollaron colonias con crecimiento tubular que hicieron contacto con la tapa superior de la cápsula de Petri. Se observa en vista lateral dicha morfología (Fig. 5b), mientras que al 2% de agar se observaron colonias verrugosas de color verde oscuro. Se puede señalar que las colonias crecidas en agar al 1%, 1,5 y 2% desarrollaron espacios aéreos en el interior de las mismas.

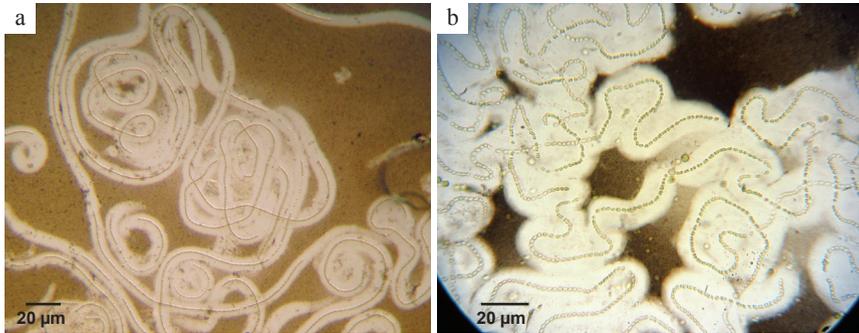
La presencia de exopolisacáridos capsulares (EPSC) dependiendo de la suficiencia de nitrógeno en medio BG11c o de la limitación de nitrógeno en medio BG11<sub>0</sub> fue revelada mediante la prueba de tinción negativa. Los resultados reve-



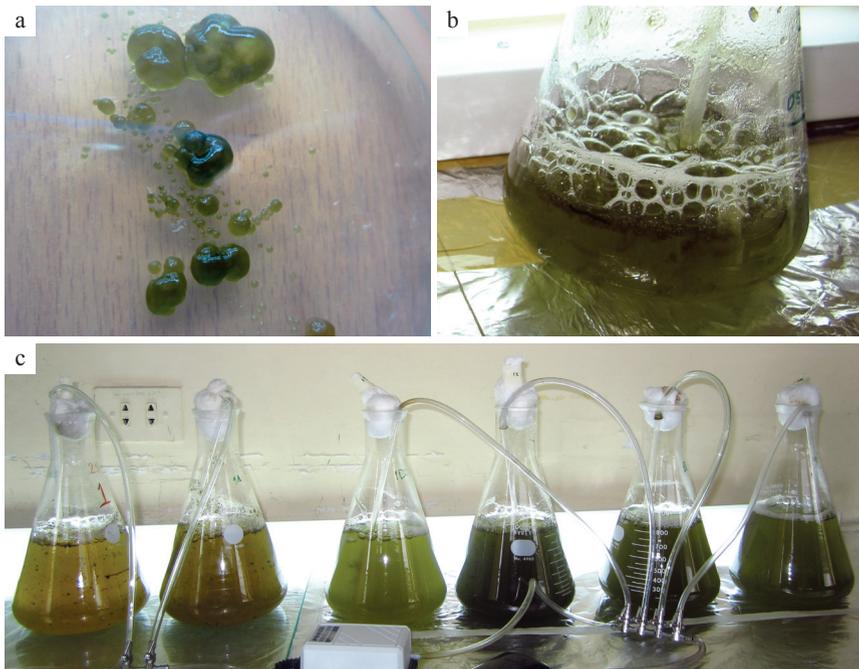
**Fig. 5.** Colonias de *Nostoc* sp. en medio sólido en agar. **a.** Colonias globosas y gelatinosas de color verde claro, crecidas en medio BG11<sub>0</sub> en agar al 1%. **b.** Vista lateral de colonia de *Nostoc* sp. en BG11<sub>0</sub> al 1,5%, con crecimiento tubular hasta el tope de la cápsula de Petri. **c.** Colonias gelatinosas de color marrón en BG11c con el 25% de nutrientes y en agar al 1%. **d.** Colonias globosas, de color verde oscuro crecidas en medio BG11<sub>0</sub> en agar al 2%.

laron una capa muy gruesa de EPSC, llegando a formar una sola envoltura que recubre todos los filamentos como signo de acumulación de estos exopolisacáridos en los cultivos limitados en nitrógeno (BG11<sub>0</sub>). En cambio en *Nostoc* sp., crecido en medio BG11c con 25% de nutrientes, se observó una capa o cápsula fina de EPSC (Fig. 6).

El escalado en cultivos líquidos, desde 25 ml hasta 1000 ml en condiciones de laboratorio, se logró a partir de la transferencia de las colonias de *Nostoc* sp. desde el medio sólido a medio líquido con BG11<sub>0</sub>, BG11c y BG11c al 25% de nutrientes, de tal manera, que la adaptación del medio sólido al líquido se produjo con éxito desde que las macrocolonias fueron trasladadas al laboratorio, hasta lograr su aislamiento y por último alcanzar cultivos discontinuos hasta 1 l de medio BG11 (Fig. 7).



**Fig. 6.** Exopolisacáridos capsulares (EPSC) en filamentos de *Nostoc* sp. del morfotipo verrugoso verde (10X). **a.** Cápsula de EPSC delgada de filamentos en medio líquido BG11c. **b.** Cápsula gruesa de EPSC en filamentos de *Nostoc* sp. en medio BG11<sub>0</sub> líquido.



**Fig. 7.** Escalado de la cepa de *Nostoc* sp. en cultivos discontinuos. **a.** Colonias de *Nostoc* sp. aisladas en medio sólido BG11<sub>0</sub>. **b.** Cultivo de 25 ml en medio BG11<sub>0</sub>, procedente de la inoculación de colonias de *Nostoc* sp. **c.** Cultivos de 1000 ml en medio BG11<sub>0</sub>.

## DISCUSIÓN

Las principales dificultades en el estudio de la diversidad de cianobacterias son sus características morfológicas, la variabilidad y el grado de polimorfismo en función de diferentes ubicaciones geográficas. El análisis de diversas cepas aerofíticas de *Nostoc* sp. en zonas tropicales como los páramos de la cordillera andina ecuatoriana es novedoso y de interés para estudios de bioprospección; la búsqueda y valoración de los diferentes morfotipos que se puedan identificar en las diversas zonas de esta área geográfica.

En el presente estudio se ubicaron seis morfotipos de *Nostoc* sp. en las localidades de Cevallos-Totoras, Papallacta y Pintag situadas entre 2900 y 4025 m snm, los cuales se identificaron como esférico-gelatinoso (I), gelatinoso (II), amorfo-gelatinoso (II), verrugoso verde (III), verrugoso negro (IV), globoso (V), granuloso-gelatinoso (VI).

Estos seis morfotipos de *Nostoc* sp. podrían tratarse de diferentes especies de este género o estar relacionados con la misma especie, en distintos estadios de su ciclo de vida. Tal es el caso de *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault, que puede presentar variaciones de su morfología desde gelatinoso, globoso y esférico, después aplanado expandido y al final ondulado (Pereira *et al.* 2005), lo que sugiere ser una evidencia para estos morfotipos identificados en los tres sectores de la cordillera andina del Ecuador. No obstante, hay que tomar en cuenta la complejidad taxonómica del género *Nostoc*, debido a que es necesario dilucidar la existencia de distintas especies de cianobacterias con esta diversidad, mediante una combinación de la biología molecular, caracterización morfológica y estudios ecofisiológicos (Sant'Anna *et al.* 2007; Mateo *et al.* 2011).

Los morfotipos verrugoso verde y verrugoso negro fueron los que se encontraron en casi todos los muestreos realizados, aunque en cuanto a la cantidad y morfología éstos variaron drásticamente en ciertas épocas del año, a diferencia de los meses comprendidos entre marzo y mayo, donde se encontraron colonias muy hidratadas y gelatinosas correspondientes a los morfotipos I, II, V y VI. Estas observaciones permiten sugerir que la morfología de las macrocolonias depende de las condiciones ambientales (Kantz & Bold 1969; Komárek & Anagnostidis 1989; Potts 2000).

En *Nostoc* cf. *commune* también se han descrito los estadios de humedad-deshidratación en condiciones de campo, los cuales se acoplan a los eventos climatológicos tales como desarrollo de la colonia durante la estación lluviosa, preparación para el efecto de la sequía, supervivencia de la desecación y finalmente la rehidratación combinada con el aumento del número de propágulos (Ramírez *et al.* 2011). Estas condiciones proporcionan cambios en la estructura de la morfología celular, en la producción de vaina mucilaginosa y en la aparición o desaparición de vesículas de gas tanto en condiciones ambientales como a nivel de laboratorio, lo cual le confiere modificaciones adaptativas ante los cambios de humedad y de sequía (Lehtimäki *et al.* 2000; Roldan *et al.* 2006).

El contenido de clorofila *a* y de carotenoides de cianobacterias aerofíticas crecidas sobre rocas húmedas, suelos, entre vegetación, en la corteza de los árboles en los bosques lluviosos permite relacionar las condiciones ambientales a las cuales están expuestas las colonias, en cuanto a disponibilidad de nutrientes, exposición a luz extrema y período de sequía. El morfotipo que mostró altos contenidos de clorofila *a* fue el verrugoso negro; muy probablemente sus altos valores se deban a que fueron los que se encontraron más expuestos a la radiación solar, sobre las piedras y con poca o ninguna vegetación entre éstos. Al respecto, Dodds (1989) reporta que en *Nostoc parmelloides* existe una correlación entre el contenido de clorofila *a*, la luz y la presencia de oxígeno en el ambiente en el cual se desarrolle la cianobacteria. Además, sugiere que el contenido de clorofila *a* puede llegar a ser diferente entre las células de la superficie y las que se encuentran en contacto con la periferia del suelo o de rocas, en una misma macrocolonia. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los procesos fotosintéticos en condiciones naturales en *Nostoc* sp. y en la mayoría de cianobacterias ya que la mayor parte de estudios fotosintéticos en cianobacterias se han realizado en condiciones de laboratorio (Campbell 1996; Lange *et al.* 1998).

Los morfotipos con mayor contenido de carotenoides fueron el gelatinoso y el esférico, encontrados a una irradiación similar a los morfotipos verrugosos y fueron justamente éstos los que presentaban un color marrón en sus filamentos y colonias. La cantaxantina,  $\beta$ -caroteno y la myxoxantofila en cianobacterias están relacionadas con la disipación del calor y la fotoprotección (Albrecht *et al.* 2001; Lakatos *et al.* 2001). Es posible que la exposición a elevada irradiación pueda estimular la acumulación de estos carotenoides en estos morfotipos.

Entre otras de las estrategias ecofisiológicas de estos morfotipos, se demostró la capacidad de tolerancia a la desecación, al menos del verrugoso verde (IV), de tal manera que todas sus propiedades fisiológicas fueron reactivadas como producto de la hidratación aplicada a las muestras y la recuperación de sus características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas en cuanto a la inducción de heterocistos y desarrollo de las células vegetativas. Potts (2000) comprobó la tolerancia de *Nostoc commune* en condiciones adversas de sequía cuando fue hidratada después de largos periodos de sequía.

En este estudio se observó que la estructura clave en la tolerancia a la desecación de *N. commune* es su vaina mucilaginosa, ya que la misma pasó de una condición áspera cuando estaba deshidratada a una suave y gelatinosa a los pocos minutos de haber sido sumergida en medio de cultivo. A la vez, contribuye sustancialmente al aumento de su peso y al volumen de las colonias (Scherer & Potts 1989). Se ha descrito que la vaina mucilaginosa en cianobacterias contiene entre 57 y 84% de carbohidratos y la fracción proteica corresponde entre el 7 y 24% del total del polisacárido (Richert *et al.* 2005), lo cual constituye un polímero con capacidad reversible en cuanto al efecto de la hidratación y deshidratación. De tal modo, que la vaina mucilaginosa puede acumular gran cantidad de agua, y luego perder agua progresivamente, evitando así el daño por el exceso de temperatura y

alta irradiación (Gao 1998; Shaw *et al.* 2003; Danxiang *et al.* 2004).

*Nostoc* sp. tiene, además, la capacidad de mantener las proteínas en un estado funcionalmente estable, lo cual permite mantener el ADN y repararlo eficientemente una vez que las condiciones sean las adecuadas, siendo esto importante en la tolerancia a la desecación (Whitton & Potts 2000). La desecación también puede mejorar la elasticidad de la textura de la vaina mucilaginosa, de manera que se puede evitar la desintegración de los filamentos en posteriores desecaciones o incluso aumentar la firmeza de la vaina cuando *Nostoc* sp. se encuentra creciendo en condiciones líquidas, esto debido a que la desecación favorece la síntesis de proteínas de resistencia en algunas especies de *Nostoc* (Zhong *et al.* 1992).

El morfotipo verrugoso verde, luego de ser aislado en medio sólido y cultivado en medio BG11 y BG11<sub>0</sub> (Rippka *et al.* 1979), demostró su capacidad de crecimiento y libre de microalgas, de otras cianobacterias asociadas e incluso de hongos, por lo cual se logró mantener la cepa tanto en cultivos sólidos como en líquidos hasta ser escalada hasta un volumen de 1 litro. Incluso, se demostró la capacidad de esta cepa de *Nostoc* sp. en cambiar su color de verde a marrón, tal como puede ocurrir en condiciones naturales y posiblemente debido a las variaciones de las intensidades luminosas en los cultivos, los cuales inciden en la modulación de la síntesis de la clorofila (Rodulfo 1983).

Se observó también que en cultivos con BG11c al 25% de concentración en todos sus nutrientes, el crecimiento fue muy similar al crecimiento en medio de cultivo BG11c con todos sus nutrientes; esto indica que la capacidad de crecimiento de esta cepa de *Nostoc* sp. muestra variabilidad fisiológica para adaptarse incluso a medios limitados de nutrientes. Sin embargo, el mayor éxito de *Nostoc* sp. es tener capacidad de crecimiento sostenido en ausencia de fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo, en virtud de fijar nitrógeno atmosférico, lo cual es una estrategia ventajosa en cuanto a la reducción de contaminación por otros microorganismos, y a la producción de biomasa solo con la aireación que se le provea al sistema de cultivo, además de reducir los costos de producción solo con el uso de un medio de cultivo con fósforo, azufre, CO<sub>2</sub> y oligoelementos.

La diversidad morfológica de la cianobacteria aerofítica *Nostoc* en los Andes ecuatorianos, según área geográfica, período de lluvia y de sequía, convierten a este género en un recurso biológico valioso para estudios fisiocológicos, de bioprospección y biotecnología por su capacidad de tolerancia ante ambientes extremos y por su adaptación a las condiciones de laboratorio para la producción de biomasa enriquecida con metabolitos de importancia económica.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo científico ha sido financiado por el Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (Ecuador) y ha contado con la infraestructura de la Unidad de Biología del Centro de Ciencias de la Universidad Central del Ecuador.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Albrecht, M., S. Steiger & G. Sandmann. 2001. Expression of a ketolase gene mediates the synthesis of canthaxanthin in *Synechococcus* leading to tolerance against photoinhibition, pigment degradation and UV-B sensitivity of photosynthesis. *Photochem. & Photobiol.* 73: 551-555.
- Aldave-Pajares, A. 1969. Cuschuro, algas azul-verdes utilizadas como alimento en la región altoandina peruana. *Bol. Soc. Bot. La Libertad* 1(2): 9-22.
- Arenas, P. 2009. *Etnofitología aplicada: estudio de casos en relación a la salud y la alimentación en ambientes rurales y urbanos*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Red Iberoamericana de Saberes y Prácticas Locales sobre el Entorno Vegetal (RISA-PRET), San Salvador de Jujuy.
- Arredondo, B. & D. Voltolina. 2007. Determinación de peso seco y contenido orgánico. In: Arredondo, B. & D. Voltolina (eds). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, pp. 27-40. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz.
- Britton, G. 1985. General carotenoids methods. *Methods Enzymol.* 111: 113-158.
- Campbell, Q. 1996. Predicting light acclimation in cyanobacteria from nonphotochemical quenching of photosystem II fluorescence, which reflects state transitions in these organisms. *Pl. Physiol.* 111: 1293-1298.
- Castree, N. 2003. Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transaction of the Institute of British Geographers* 28(1): 35-55.
- Dai, Z. 1972. Review of *Nostoc flagelliforme* research. *J. Ningxia Univ.* (Nat. Sci.). 13(1): 71-76.
- Danxiang, H., B. Yonghong & Z. Hu. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-species of high potential. In: Richmond, A. (ed). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, pp. 304-311. Blackwell Science.
- Dodds, W. 1989. Microscale vertical profiles of N<sub>2</sub> fixation, photosynthesis, chlorophyll a, and light in a cyanobacterial assemblage. *Appl. Environm. Microbiol.* 55(4): 882-886.
- Gao, K.S. 1998. Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *J. Appl. Phycol.* 10: 37-49.
- Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. In: Rabenhorst, L. (ed.). *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. 14: 673-1196. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Herdman, M., R. Castenholz & R. Rippka. 2001. Formgenus VIII. *Nostoc* Vaucher 1803. In: Boone, D.R. & R.W. Castenholz (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. 1: 575-580. Springer-Verlag, New York.
- Kantz, T. & H. Bold. 1969. *Phycological studies. IX. Morphological and taxono-*

- mic investigations of Nostoc and Anabaena in culture*. University of Texas Publication No. 6924, Austin.
- Katoh, H., Y. Shiga, Y. Nakahira & M. Ohmori. 2003. Isolation and characterization of a drought-tolerant cyanobacterium *Nostoc* sp. HK-01. *Microbes and Environments* 18(2): 82-88.
- Komárek, J. & K. Anagnostidis. 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. *Algol. Stud.* 56: 247-345.
- Lakatos, M., W. Bilger & B. Bu. 2001. Carotenoid composition of terrestrial cyanobacteria: response to natural light conditions in open rock habitats in Venezuela. *Eur. J. Phycol.* 36: 367-375.
- Lange, O., J. Belnap & H. Reichenberger. 1998. Photosynthesis of the cyanobacterial soil-crust lichen *Collema tenax* from arid lands in southern Utah, USA: role of water content on light and temperature responses of CO<sub>2</sub> exchange. *Funct. Ecol.* 12: 195-202.
- Lehtimäki, J., C. Lyra, S. Suomalainen, P. Sundman, L. Rouhiainen, L. Paulin, M. Salkinoja & K. Sivonen. 2000. Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1043-1053.
- Marker, A. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biol.* 2: 361-385.
- Marker, A., E. Nusch, H. Rai & B. Riemann. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Ergebn. Limnol.* 14: 91-106.
- Mateo, P., E. Perona, E. Berrendero, F. Leganes, M. Martín & S. Golubic. 2011. Life cycle as a stable trait in the evaluation of diversity of *Nostoc* from biofilms in rivers. *F.E.M.S. Microbiol. Ecol.* 76(2): 185-198.
- Morales, E. 2012. *Manual de laboratorio de Ficología*. Carrera de Microbiología. Escuela de Bioanálisis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Morales, E., V. Luna, L. Navarro, V. Santana, A. Gordillo & A. Arévalo. 2013. Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras evaluadas para la colección de cultivos de microorganismos fotosintéticos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 34(1, 2): 129-149.
- Naranjo-Briceño, L., D. Rojas-Tortolero, H. González, R. Torres, J. Zegarra, L. Sena-D'Annal & D. Sosa. 2010. *Arthrospira platensis* como biofactoria de metabolitos secundarios de interés farmacológico: el ácido piperólico. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal* 1(1): 64-90.
- Nemergut, D., S. Anderson, C. Cleveland, A. Martin, A. Miller, A. Seimon & S. Schmidt. 2007. Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microbial Ecol.* 53: 110-122.
- Otero, A. & M. Vincenzini. 2003. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nos-*

- toc* strains as affected by N source and light intensity. *J. Biotechnol.* 102(2): 143-152.
- Otero, A. & M. Vicenzini. 2004. *Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *J. Phycol.* 40(1): 74-81.
- Pereira, I., M. Moya, G. Reyes & V. Kramm. 2005. A survey of heterocystous nitrogen-fixing cyanobacteria in Chilean rice fields. *Gayana, Bot.* 62(1): 26-32.
- Potts, M. 2000. *Nostoc*. In: Whitton, B.A. & M. Potts (eds.). *The ecology of cyanobacteria; their diversity in time and space*, pp. 466-504. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Pulgar, J. 1987. *Geografía del Perú: las ocho regiones naturales del Perú*. Novena edición. Promoción Editorial Inca, Lima.
- Quian, K., H. Zhu & S. Chen. 1989. The ecological condition of *Nostoc flagelliforme* and their analysis. *Acta Phytoecol. Geobot.* 19: 97-105.
- Ramírez, M., M. Hernández-Marinéa, P. Mateo, E. Berrendero & M. Roldán. 2011. Polyphasic approach and adaptative strategies of *Nostoc cf. commune* (Nostocales, Nostocaceae) growing on Mayan monuments. *Fototea* 11(1): 73-86.
- Richert, L., S. Golubic, R. Le Guedes, J. Ratiskol, C. Payri & J. Guezennee. 2005. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. *Curr. Microbiol.* 51(1): 379-384.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman & R. Stainer R. 1979. Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- Rodulfo, B.R. 1983. A study of *Nostoc linckia* (Roth) Bornet locally known as "Tabtaba". M.S. Thesis. Gregorio Araneta University Foundation. Malabon, Metro Manila-Filipinas.
- Roldan, M., F. Oliva, M. González, C. Saiz & M. Hernández. 2006. Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms? *Appl. Environm. Microbiol.* 72: 3026-3031.
- Rosales, N. 2007. Evaluación de la actividad biológica de extractos de la cyanobacteria *Nostoc* Laun 0015, en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- Sant'Anna, C., M. de Paiva, L. Zanini & J. Komárek. 2007. New aerophytic morphospecies of *Nostoc* (Cyanobacteria) from São Paulo State, Brazil. *Hoehnea* 34(1): 95-101.
- Scherer, S. & M. Potts. 1989. Novel water stress protein from a desiccation-tolerant cyanobacterium: purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 264: 12546-12553.
- Shaw, E., D. Hill, N. Brittain, D. Wright, U. Täuber, H. Marand, R. Helm & M. Potts. 2003. Unusual water flux in the extracellular polysaccharide of

- the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environm. Microbiol.* 69(9): 5679-5684.
- Strickland, J. & T. Parsons. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, Ottawa.
- Villagrán, C., M. Romo & V. Castro. 2003. Etnobotánica del sur de los Andes de la primera región de Chile: un enlace entre las culturas altiplánicas y las de quebradas altas del Loa superior. *Chungará, Revista de Antropología Chilena* 35(1): 73-124.
- Whitton, B. & M. Potts 2000. Introduction to cyanobacteria. In: Whitton, B. & M. Potts (eds.). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, pp. 281-306. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Yu, H., S. Jia & Y. Dai. 2008. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *J. Appl. Phycol.* 21: 127-133.
- Zhong, Z., D. Shi & F. Wang. 1992. Effects of temperature, water content and light intensity on nitrogenase activity of *Nostoc flagelliforme*. *Acta Bot. Sin.* 34(3): 219-225.

