

Desarrollo y caracterización de un consorcio de cianobacterias aislado de suelo rizosférico de *Carica papaya*

Development and characterization of a cyanobacteria consortium
isolated from rhizospheres' soil of *Carica papaya*

Yadenis Ortega-Díaz¹ <https://orcid.org/0000-0001-9674-9785>

Liliana Gómez-Luna¹ <https://orcid.org/0000-0002-1282-3392>

Yadira Silveira-Font¹ <https://orcid.org/0000-0002-6043-2003>

Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Universidad de Oriente.
Santiago de Cuba. Cuba

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: yadenis.ortegadiaz@gmail.com

RESUMEN

En la actualidad los avances biotecnológicos demuestran el potencial de las cianobacterias en diversas áreas, convirtiéndose así en un grupo de alto valor económico. El presente estudio tuvo como objetivo la obtención y desarrollo por vía biotecnológica de un consorcio de cianobacterias aislado a partir de suelo rizosférico de *Carica papaya*. El cultivo se realizó en medio de cultivo BG11₀, con aireación de 0,32 Lmin⁻¹, a una intensidad luminosa de 48,83 μEm⁻²s⁻¹, con una temperatura de 22 °C ± 2. Se aísla y desarrolla un consorcio conformado por las especies *Nostoc commune*, *Calothrix* sp. y *Aphanothece mitussima*. Se constata el desarrollo efectivo de este consorcio a nivel de laboratorio, con valores de clorofilas, carotenos, proteínas y lípidos al finalizar el ensayo de 0,18 ±0,02 μgmL⁻¹, 0,12 ±0,004 μgmL⁻¹, 31,25±8,49% y 13,92±2,95%

respectivamente, y una disminución de las concentraciones de nitrato $4,03\pm 0,12$ mgL^{-1} en el medio. Los valores más elevados de ficocianina se obtuvieron a los 21 días de iniciados los experimentos ($4,38\pm 0,001$ μgmL^{-1}), lo que permite ampliar el espectro de microorganismos obtenidos de la rizosfera con potencialidades como bioestimuladores del crecimiento.

Palabras clave: consorcio de cianobacterias; suelo rizosférico; *Carica papaya*.

ABSTRACT

Currently, biotechnological advances demonstrate the potential of cyanobacteria in various areas, thus becoming a group of high economic value. The objective of this study was to obtain and develop, by biotechnological means, a consortium of cyanobacteria isolated from the rhizospheric soil of *Carica papaya*. The culture was carried out in BG110 culture medium, with aeration of $0,32$ Lmin^{-1} , at a light intensity of $48,83$ $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, with a temperature of 22 $^{\circ}\text{C} \pm 2$. A consortium formed was isolated and developed by the species *Nostoc commune*, *Calothrix* sp. and *Aphanothece mitissima*. The effective development of this consortium at the laboratory level is verified, with values of chlorophylls, carotenes, proteins and lipids at the end of the test of $0,18 \pm 0,02$ μgmL^{-1} , $0,12 \pm 0,004$ μgmL^{-1} , $31,25\pm 8,49\%$ and $13,92\pm 2,95\%$ respectively, and a decrease in nitrate concentrations of $4,03\pm 0,12$ mgL^{-1} in the medium. The highest values of phycocyanin were obtained 21 days after the start of the experiments ($4,38\pm 0,001$ μgmL^{-1}), which allows expanding the spectrum of microorganisms obtained from the rhizosphere with potential stimulators.

Keywords: cyanobacteria consortium; rhizospheres soil; *Carica papaya*.

Recibido: 15/01/2023

Aceptado: 18/04/2023

Introducción

Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno existen varias especies de cianobacterias, grupo muy diverso de organismos procarióticos fotoautótrofos pertenecientes al dominio Bacteria, que sintetizan clorofila *a* y ficobilinas, capaces de realizar procesos de vital importancia, como la fotosíntesis oxigénica.⁽¹⁾ A pesar de tener una organización estructural y bioquímica que se corresponde con las bacterias Gramnegativas, las cianobacterias presentan características fotosintéticas similares a las algas eucariotas y plantas superiores.⁽²⁾

En la actualidad, los avances biotecnológicos han demostrado el potencial que poseen las cianobacterias en diversas áreas, convirtiéndose en un grupo de alto valor económico.⁽³⁾ Entre sus principales aplicaciones se encuentran aquellas vinculadas a la capacidad de fijación de nitrógeno, proceso que se puede llevar a cabo en células especializadas y diferenciadas morfológicamente llamadas heterocistos.⁽⁴⁾ Dicha característica posee un alto valor agronómico, fundamentándose en esta su utilización como biofertilizante natural en varios cultivos y acondicionador de suelo.⁽⁵⁾

Estos microorganismos durante su ciclo de vida incrementan la materia orgánica y excretan compuestos bioactivos (fitohormonas, vitaminas, aminoácidos), que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de mejorar la estructura del suelo, lo que influye en su permeabilidad y capacidad de retención de agua.⁽⁶⁾ Otro aspecto a destacar es que liberan metabolitos secundarios que ayudan al control biológico de enfermedades bacterianas y fúngicas en los cultivos, reportándose, además, que contribuyen a la conversión de formas de fósforo insolubles a formas asimilables por las plantas.⁽⁷⁾

En general se atribuye a las cianobacterias y sus consorcios buenos resultados en cuanto a la mejora de suelo, así como mayor porcentaje de germinación y producción.⁽⁸⁾ Destacan las investigaciones sobre la inoculación de cianobacterias en cebada, trigo, avena, rábano, pepino, tomate, calabaza, algodón, caña de azúcar, chile y lechuga, con resultados positivos en la germinación, rendimiento y

calidad del producto final. ^(7, 9) Por otra parte, se han constatado los beneficios de los géneros *Nostoc*, *Tolypothrix*, *Anabaena* y *Aulosira* en arrozales.

El uso de cianobacterias como biofertilizantes para cultivos se posiciona entonces como una alternativa ecológicamente positiva y sustentable, ya que para producir este tipo de biofertilizante se puede utilizar agua no potable, lixiviados orgánicos, CO₂ atmosférico, desarrollando sus cultivos en espacios reducidos o incluso en tierras poco productivas, en sistemas de fotobiorreactores.^(10,11,12,13)

El objetivo de esta investigación fue obtener por vía biotecnológica un consorcio natural de cianobacterias a partir de suelo rizosférico de *Carica papaya*, para la posterior evaluación de sus potencialidades y beneficios. Los objetivos específicos estuvieron enfocados en desarrollar cultivos densos del consorcio obtenido y determinar su perfil bioquímico.

Materiales y métodos

Crecimiento y mantenimiento del cultivo

El consorcio de cianobacterias fue obtenido a partir de un subcultivo en placa Petri de suelo rizosférico de *Carica papaya*, el que se realizó por triplicado, incubando en medio BG11₀⁽¹⁴⁾ durante 30 días, a una temperatura de 22°C ± 2, bajo régimen de luz continua a una intensidad de 48,83 μEm⁻²s⁻¹ (Luz día, Phillips, 40W) obteniendo de esta forma el cultivo primario. A partir de la detección inicial de crecimiento se identifican las cianobacterias presentes, clasificando hasta especie siempre que fue posible, en todos los cultivos primarios obtenidos, para lo que se utilizaron varias claves dicotómicas y criterios taxonómicos.^(15,16,17)

A partir de los crecimientos primarios se desarrollan subcultivos sólidos y aislamientos en medio BG-11₀ líquido, utilizando tubos de ensayo con tapa de rosca de 10 mL y placas Petri. De esta forma se obtienen los pre-inóculos para el establecimiento de los consorcios naturales.

Condiciones experimentales para el desarrollo de los consorcios de cianobacterias

Para el desarrollo de los consorcios se utilizan frascos de 1000 mL de capacidad, estableciendo cultivos discontinuos a partir de un inóculo de 100 mL. Se establecen consorcios obtenidos de forma natural a partir de previos aislamientos.⁽⁸⁾

Medio de cultivo

El medio BG-11₀, sin nitrógeno, se formula con la finalidad de promover la fijación del nitrógeno; ⁽¹⁴⁾ este fue modificado al sustituir los microelementos por solución de Algal (BIONOVA, S.A).

Condiciones generales de la instalación

Se establecen cultivos aireados con un flujo de aireación continua de 0,32 Lmin⁻¹, a una temperatura promedio de 20 ±2⁰C, con iluminación continua obtenida por medio de lámparas fluorescentes de 40 W, a una intensidad luminosa de 48,83 μEm⁻²s⁻¹. Esta fue medida y ajustada diariamente con una estación meteorológica (TP LM 8000 4 en 1, China, error: ±8 lx). La aireación previene el auto ensombrecimiento y la fotoinhibición, así como el incremento del tiempo de exposición de las células en zonas iluminadas y la frecuencia de iluminación de estas. ⁽¹⁸⁾

Los valores de pH fueron medidos y ajustados convenientemente con un pH metro Mettler Toledo AG (China), manteniendo los valores entre 7 y 7,6 u. Cada cultivo se realizó por triplicado.

La cinética de crecimiento se evaluó mediante la determinación de la concentración de pigmentos y el peso seco de los cultivos.⁽¹⁹⁾

Metodología para el análisis de la concentración de pigmentos fotosintéticos

Se evaluó el porcentaje de clorofila a y carotenoides de cada consorcio, para lo cual se tomaron 5 mL de cultivo, previa homogenización con un vortex WiseMix VM-10 (Corea), realizando seis réplicas por experimento. Las muestras se centrifugaron en una centrifuga Sigma 3-16KL (Alemania) a 10 000 g durante 15 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur. A partir del pellet se realizó la extracción mediante la adición de 2 mL de metanol al 95% (Quality Chemicals, España). Este procedimiento se realizó durante 24 h en oscuridad, a -4°C, para evitar la oxidación de las clorofilas.

Previa medición de la densidad óptica, las muestras se clarifican por centrifugación a 10 000 g durante 5 min. Se realizan mediciones del sobrenadante en un espectrofotómetro Thermo Genesys 10S UV-Vis (China) ⁽⁸⁾ a 480 y 665 nm, diluyendo convenientemente, previa lectura en el espectrofotómetro. La concentración de pigmentos fotosintéticos se obtuvo a partir de la ecuación propuesta por Marker: ⁽²⁰⁾

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (A_{665} * 12,7) * VE \div VM \dots\dots\dots (1)$$

Para la determinación de los pigmentos carotenoides se utilizó la ecuación propuesta por Strickland y Parsons ⁽²¹⁾ (1972):

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (A_{480} * 4) * VE \div VM \dots\dots\dots (2)$$

donde

VE es el volumen del extracto y VM el volumen de la muestra (5mL).

Para la extracción de las ficobiliproteínas: ficocianina (FC), aloficocianina (AFC) y ficoeritrina (FE) se tomaron 5 mL de cultivo, previa homogenización, realizando seis réplicas por experimento, de acuerdo con la descripción previa. Cada muestra se centrifugó a 10 000 g por 15 min, utilizando una centrifuga Sigma 3-16KL (Alemania).

Se descartó el sobrenadante y se añadieron 4 gotas de glicerol (BDH PROLABO®, Ecuador) al pellet. La extracción se realizó en oscuridad a -4°C durante 24 h. Se induce así la ruptura celular con la aplicación del proceso de congelación-descongelación de la biomasa de cianobacterias, a lo que se suma el efecto osmótico con glicerol, para la liberación de los pigmentos hidrosolubles de naturaleza proteica, tanto de las ficoeritrinas como de las ficocianinas, ⁽²²⁾ realizando dos congelaciones y descongelaciones sucesivas.

Una vez retirada la muestra del congelador se añaden 2 mL de agua destilada y se agita vigorosamente, homogenizando con la ayuda del vortex. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 g por 15 min. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro a 562, 615 y 652 nm. Para el cálculo de la concentración de ficobiliproteínas se utilizaron las fórmulas propuestas por Bennett y Bogorad. ⁽²³⁾

$$\text{Ficocianina(mg mL}^{-1}\text{)} = DO615 - (DO652 * 0,474) \div 5,34 * VE \div VM \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{Aloficocianina(mg mL}^{-1}\text{)} = (DO652 - (DO615 * 0,208)) \div 5,09 * VE \div VM \dots\dots\dots (4)$$

$$\text{Ficoeritrina(mg mL}^{-1}\text{)} = (DO562 - (FC * 2,41) - (AFC * 0,849)) \div 5,34 * VE \div VM \dots\dots\dots (5)$$

donde

VE es el volumen del extracto (4mL) y VM el volumen de la muestra (5mL)

Metodología para la determinación del peso seco: el peso seco se determinó en días alternos durante 21 días, según la técnica propuesta por Tredici y col. (1991). ^(24, 25) Para ello se tomaron alícuotas de 10 mL de cultivo y se filtraron por medio de membranas de celulosa de 5 µm de diámetro de poro (Millipore®), previamente secadas y pesadas. Se utilizó una estufa (MCW WS200, GRR), sometiendo las muestras a 70 °C por 24 h. Los pesajes se realizaron en una balanza digital analítica (OHAUS PA114C, Estados Unidos). Se realizaron tres

réplicas por muestra. Con estos resultados se ajustan los valores de la concentración de pigmentos, expresándolos en mgL^{-1} .

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó transcurridos 21 días del cultivo, a través del método propuesto por Lowry. ^(26, 27)

El contenido de proteínas se calculó según la siguiente ecuación (López y col., 2010): ⁽²⁸⁾

$$\text{Proteína}(\%m/m) = (C * V * D \div m) * 100 \dots \dots \dots (6)$$

donde:

C es la concentración de proteína (mgL^{-1}) obtenida de la curva de calibración,

V es el volumen (L),

D es el factor de dilución y

m peso de biomasa seca (mg).

Cuantificación de lípidos

A los 21 días de cultivo, las muestras fueron cosechadas por centrifugación a 15 000 g por 10 min a 20°C, con una centrífuga refrigerada (Sigma 3-16KL, Alemania). Las muestras fueron secadas en estufa (Boxun, China), a 80°C. La determinación de lípidos se realizó a partir del método de Ryckebosh, ⁽²⁹⁾ utilizando como solvente de extracción la mezcla Folch (cloroformo: metanol; v: v). El contenido de lípidos en las muestras (% m/m) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Lípidos}(\%m/m) = (mE \div mM) * 100 \dots \dots \dots (7)$$

donde:

mE- peso extraído de lípidos

(mM)- peso de muestra

Determinación de nitrato en el medio de cultivo

Para la determinación del contenido de nitrato del medio se colectan 100 mL de sobrenadante, previa centrifugación del cultivo a 15 000 g por 10 min, a 20 °C, con una centrífuga refrigerada (Sigma 3-16KL, Alemania). Las determinaciones se realizan a los días 7, 14, 21 días, para establecer las comparaciones pertinentes. Las muestras fueron refrigeradas para su traslado al Laboratorio de la Empresa Nacional de Análisis y Servicios Técnicos, donde se realizaron las determinaciones por el método de electrodo selectivo, ensayo que cumple los requisitos de la Norma Cubana NC-ISO/IEC 17025:2006.⁽³⁰⁾

Análisis estadísticos

Se realizó un Diseño Completamente Aleatorizado con la prueba Kolmogorov - Sminov, y un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, con una prueba t de Student, para una $p < 0,05$.

Resultado y discusión

Descripción del consorcio

El consorcio de cianobacterias fue obtenido de forma natural a partir de subcultivos y aislamientos de suelo rizosférico de *Carica papaya*. En la figura 1, se muestra la apariencia de las colonias obtenidas en el cultivo primario. Estas son de aspecto gelatinoso con color verde intenso y bordes irregulares. Las cianobacterias identificadas son: *Nostoc commune*, *Calothrix* sp., *Aphanothece mitussima* (figura 2); siendo *Calothrix* sp. la especie mayoritaria.



Fig. 1- Apariencia de las colonias obtenidas en el cultivo primario de suelo rizosférico de *Carica papaya* con medio BG11o



Fig. 2- Vista al microscopio óptico del consorcio con presencia de las cianobacterias *Nostoc commune*, *Calothrix* sp., *Aphanothece mitussima*, a 40x

Entre las cianobacterias nitro fijadoras más comunes está el género *Nostoc*, el que incluye un grupo variable de especies que se caracterizan por la formación de grandes colonias gelatinosas.⁽³¹⁾ Posee ciclos de vida complicados, con la formación de hormogonios móviles, que participan en la reproducción,⁽³²⁾ en la dispersión de las especies en su hábitat natural,⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾ y en asociaciones simbiotes.⁽³⁵⁾ En la mayoría de los casos se desarrolla en el tricoma un solo

heterocisto en ambos extremos e intercalados, a una distancia más o menos constante, mientras que los acinetos se presentan en largas cadenas.⁽³⁶⁾

El tamaño y forma de la célula, el tipo de heterocistos y forma de las colonias macroscópicas son usados normalmente como caracteres distintivos en la taxonomía tradicional ⁽³¹⁾. Son comunes en hábitats terrestres y acuáticos ⁽³⁴⁾ donde juegan un papel significativo a nivel ecosistémico. Tienen la capacidad de fijar nitrógeno, mejoran la calidad de los suelos pobres en nutrientes, incrementan de forma natural la productividad en arrozales no fertilizados, ^(34, 37) y ayudan a la estabilización del suelo.⁽³⁸⁾ Algunas especies forman asociaciones simbióticas con hongos (para formar líquenes), hepáticas, briófitos, cicadas, helechos, e incluso con angiospermas.⁽³²⁾ No se ha descrito previamente su presencia en ambientes de cultivo de *Carica papaya*.

Otro género muy común es *Calothrix*; este se caracteriza por presentar tricomas atenuados dispuestos de forma paralela entre sí y perpendiculares a la superficie. Pueden estar entremezclados, formando colonias, o como filamentos solitarios. ⁽³¹⁾ Normalmente los tricomas suelen terminar en un pelo multicelular, desarrollado en respuesta a la limitación de fósforo y/o hierro.⁽³⁹⁾ Tienen un heterocisto basal y, en algunas especies se pueden observar, además, heterocistos intercalados. Ocasionalmente pueden presentar falsas ramificaciones.⁽⁴⁰⁾

Los hormogonios se forman en los extremos apicales de los tricomas bajo condiciones ricas en fósforo y estos pueden tener vacuolas de gas.⁽⁴⁰⁾ Se han descrito sólo unas pocas especies de *Calothrix* capaces de desarrollar acinetos. ⁽⁴¹⁾ En diversos estudios se ha mostrado que pueden establecer asociaciones simbióticas con varios organismos eucariotas.⁽⁴²⁾

Los miembros de este género tienen una distribución global muy extendida. Se encuentran en una gran variedad de ambientes marinos, de agua dulce y terrestres, y en acantilados; ⁽⁴³⁾ en tapetes cianobacterianos antárticos, ⁽⁴⁴⁾ arrozales, ⁽⁴⁵⁾ arrecifes tropicales ⁽⁴⁶⁾ y fuentes termales ⁽⁴⁷⁾, de aquí que su presencia sea mayoritaria.

Crecimiento y perfil bioquímico de la biomasa

Para analizar el crecimiento del consorcio, una vez establecidos los cultivos, se tuvo en cuenta la variación del peso seco; este método es utilizado para determinar el crecimiento de especies filamentosas en cultivos no homogéneos, ⁽⁸⁾ en los que es difícil seguir el crecimiento por recuento celular. La variación del peso seco se presenta en la figura 3.

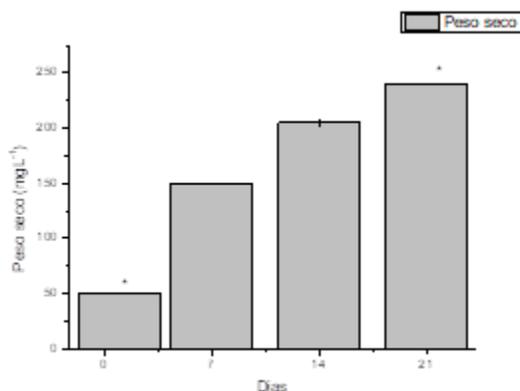


Fig. 3- Variación del peso seco del consorcio de cianobacterias obtenido a partir de suelo rizosférico de *C. papaya*, durante 21 días de cultivo

Los resultados de la evaluación de la variación del crecimiento del consorcio mediante peso seco confirman el crecimiento adecuado de este, y la existencia de especies diazótroficas, capaces de crecer en ausencia de nitrógeno.⁽¹⁾ Se alcanza un peso seco de $240 \text{ mgL}^{-1} \pm 0,02$, al final del ensayo, lo que indica que la biomasa obtenida es cinco veces mayor que la de partida ($p \leq 0,05$). La productividad media obtenida es de $11,42 \text{ mgL}^{-1}\text{día}^{-1}$. El aumento del peso seco del consorcio está relacionado principalmente con la síntesis y acumulación de proteínas, las cuales representan un porcentaje elevado del peso seco de la biomasa de cianobacterias.⁽¹⁹⁾

El medio BG11₀ es un medio selectivo exclusivo para cianobacterias con la capacidad de fijar nitrógeno, no permitiendo el crecimiento de microorganismos dependientes de otras fuentes de nitrógeno; las cianobacterias primero realizan su

fijación y luego lo utilizan para sus actividades metabólicas.⁽⁴⁸⁾ Sin embargo, en un consorcio se establecen relaciones sinérgicas entre los microorganismos, por lo que *A. minutissima*, especie no diazótrofa, crece a expensas del nitrógeno fijado por las otras dos especies del consorcio, con capacidad nitro fijadora.

Pigmentos fotosintéticos

Respecto a la composición de clorofila *a* y carotenos (figura 4), se obtuvo una concentración significativamente mayor de clorofila *a* a ambos pigmentos al día 21 de cultivo; con valores de $0,175\pm 0,004 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,10\pm 0,02$ respectivamente ($p\leq 0,05$).

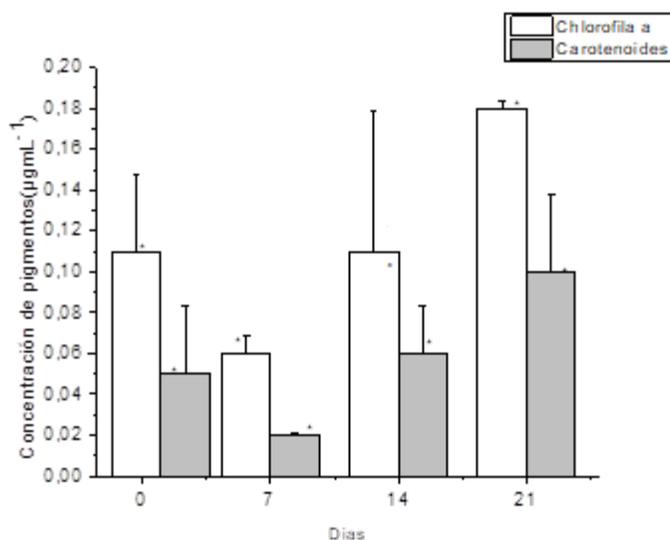


Fig. 4- Concentración de clorofila *a* y carotenoides en el consorcio de cianobacterias el primer y último día de cultivo

Bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, la síntesis de clorofila disminuye y el contenido celular empieza a declinar, mientras que los pigmentos carotenoides pueden seguir sintetizándose por más tiempo para después disminuir a una

velocidad mucho menor que la clorofila; sin embargo, la presencia de especies diazótrofes hace que aun al día 21 exista síntesis de clorofila, a expensas del nitrógeno fijado, con una concentración 1,6 veces mayor que la inicial, mientras que los carotenos se duplican; lo que definitivamente indica que existe un crecimiento celular sostenido.

La concentración de clorofilas está estrechamente relacionada con la asimilación del nitrógeno inorgánico, pues este elemento resulta esencial en la estructura de estos componentes celulares, los cuales son responsables primarios de la fotosíntesis.⁽⁴⁹⁾ Las clorofilas permiten obtener información sobre el crecimiento y la capacidad fotosintética de las cianobacterias. Además, el incremento del contenido de clorofila celular influye en la eficiencia de los complejos proteicos colectores de luz, lo que genera un aumento de la capacidad fotoquímica.

Este aumento puede contribuir al incremento del ATP utilizable en la respiración celular para la síntesis de macromoléculas (carbohidratos, proteínas, lípidos, entre otros) y en último término, es útil para evaluar la cinética de crecimiento.⁽⁵⁰⁾

Es importante señalar que los carotenoides tienen dos funciones principales: sirven como pigmentos recolectores de luz en la fotosíntesis y protegen contra el daño fotooxidativo. La síntesis y acumulación de carotenoides está regulada por las condiciones de crecimiento y las señales ambientales.^(51, 52)

En la tabla 1 se muestra la concentración de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina los días 7, 14, 21, obteniéndose una mayor concentración de aloficocianina, ficoeritrina el día 14, y de ficocianina el día 21.

Tabla 1- Concentración de ficobiliproteínas: ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina en el consorcio a los días 7,14 y 21

Días	Ficocianina (mgmL ⁻¹)	Aloficocianina (mgmL ⁻¹)	Ficoeritrina (mgmL ⁻¹)
7	0,89±0,003 ^a	9,23±0,003 ^a	8,38±0,003 ^a
14	1,42±0,001 ^b	15,24±0,009 ^b	17,78±0,001 ^b
21	4,38±0,001 ^c	6,25±0,001 ^c	8,23±0,001 ^a

Letras diferentes por columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Los diferentes géneros de cianobacterias presentan determinado contenido de ficobiliproteínas; el género *Nostoc*, por ejemplo, contiene ficocianina y ficoeritrina o ficoeritrocianina, mientras que el género *Calothrix*, al que pertenece la especie mayoritaria en el consorcio presenta mayor contenido de ficoeritrina, mostrando adaptación cromática, o bien contiene ficocianina o ficoeritrocianina.⁽⁴⁰⁾

En el consorcio hay tres especies de cianobacterias y, consecuentemente se obtienen las tres ficobiliproteínas que estas sintetizan.⁽⁵³⁾ La ficoeritrina no siempre es hallada en las cianobacterias,⁽⁵⁴⁾ pero en este caso se detectó en el consorcio natural desarrollado, lo que puede estar relacionado con la presencia de *Calothrix* sp.

Concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos y nitrato

La biomasa del consorcio tiene una composición mayoritaria de carbohidratos (47,22±8,03 %) y proteínas (31,25±8,49 %) al final del experimento (día 21); mientras que los lípidos representan el 13,92±2,95%.

Concentraciones similares se reportan en otras investigaciones,^(55, 56) en las que se explica, que de acuerdo con el género se presentan porcentajes de proteínas del 17,62% al 23,94%. Asimismo, valores similares de lípidos han sido reportados en estudios previos.⁽⁵⁷⁾

La variación de la concentración de nitrato se evaluó en los días 7,14 y 21 de cultivo, esta fue disminuyendo discretamente al transcurrir los días de establecido

el consorcio desde $5 \pm 0,16 \text{ mgL}^{-1}$ el día 7 a $4,03 \pm 0,12 \text{ mgL}^{-1}$ el día 21 ($p \leq 0,05$). Esta variación en la concentración del nitrato en el medio pudo estar relacionada al desarrollo de heterocistos.^(58, 59)

Durante la formación de heterocistes comienza la degradación específica de algunas proteínas, lo que puede conllevar a la pérdida de varias funciones, como la actividad del fotosistema II, así como la supresión y destrucción de partes de la maquinaria de fijación de CO_2 .⁽⁶⁰⁾ A pesar de que la formación del proheterocisto involucra cambios celulares profundos, este es un proceso reversible; al agregar nitrógeno al medio, este revierte hacia la forma de célula vegetativa.⁽⁶⁰⁾

Conclusiones

Se desarrolla un consorcio natural a partir de la rizosfera de *C. papaya*, el que está formado por las especies de cianobacterias diazótrofes: *Nostoc commune* y *Calothrix* sp., identificándose, además, *Aphanothece mitissima*. Se confirma la existencia de capacidad diazotrófica, siendo mayoritaria la cianobacteria *Calothrix* sp. La biomasa del consorcio tiene un contenido mayoritario de carbohidratos y proteínas.

Agradecimientos

Se agradece al Dr.C Ever Morales porque sus trabajos han constituido un antecedente metodológico importante. A la Dra.C Yilan Fung Boix y la Dra.C Elizabeth Isacc Alemán, por sus revisiones y criterios aportados para el mejoramiento de este artículo.

Referencias bibliográficas

1. WHITTON, B. A. "Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria." En: *Photosynthetic prokaryotes*. Springer, 1992, p. 1-51. DOI: 10.1007/978-1-4757-1332-9_1
2. STANIER, R. ; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual review of microbiology*. 1977, **31** (1), 225-274. ISSN: 0066-4227.
3. SINGH, S. P.; PATHAK, J. ; SINHA, R. P. Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, **69**, 578-595. ISSN: 1364-0321.
4. FLORES ENRIQUE , A. L.-L., Antonia Herrero. Nitrogen Fixation in the Oxygenic Phototrophic Prokaryotes(Cyanobacteria): The Fight Against Oxygen. En: FRANS J, D.B. *Biological Nitrogen Fixation*. 2015, p. 11. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch86>
5. RIGHINI, H.; FRANCIOSO, O.; MARTEL QUINTANA, A. ; ROBERTI, R. J. H. Cyanobacteria: A Natural Source for Controlling Agricultural Plant Diseases Caused by Fungi and Oomycetes and Improving Plant Growth. 2022, **8** (1), 58. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010058>
6. ANAND, M.; BAIDYANATH, K. ; DINA, N. Cyanobacterial consortium in the improvement of maize crop. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015, **4** (3), 264-274. ISSN: 2319-7692.
7. KHADATARE, S. ; SURYAWANSHI, D. Isolation blue green algae from maize fields of Mohol Tahasil in Solapur. En.: IJSR, 2016. ISSN (Online): 2319-7064
8. AVENDAÑO, E. M.; PÉREZ, R. M. ; RODRÍGUEZ, G. S. Aislamiento, cultivo, viabilidad y evaluación de un consorcio cianobacteria-microalga como acondicionador de suelos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. 2014, **35** (1-2), 51-71. ISSN: 2477-9148.
9. HASHTROUDI, M. S., *et al.* Endogenous auxins in plant growth-promoting Cyanobacteria—*Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola*. *Journal of Applied Phycology*. 2013, **25** (2), 379-386. ISSN: 0921-8971.
10. KUMAR, N. Algae as a Soil Conditioner. *International Journal of Engineering and Technical Research*. 2014, **2** (4), 68-70. ISSN: 2321-0869.
11. PRASAD, R. ; PRASAD, B. Cyanobacteria as a source biofertilizer for sustainable agriculture in Nepal. *J. Plant Sci. Bot. Orientalis*. 2001, **1**, 127-133. ISBN: 9781003147077

12. SAHU, D.; PRIYADARSHANI, I. ; RATH, B. Cyanobacteria–as potential biofertilizer. *CIBTech J Microbiol.* 2012, **1** (2-3), 20-26. ISSN: 2319-3867 (Online).
13. BOROWITZKA, M. A. "Culturing microalgae in outdoor ponds." En: *Algal culturing techniques*. Academic Press, 2005, p. 205-218. ISBN: 9780080456508
14. RIPPKA, R., *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology.* 1979, **111** (1), 1-61. ISSN: 1465-2080.
15. ANAGNOSTIDIS, K. ; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1-Introduction. *Hydrobiologie.* 1985, 291-302 ISSN: 0342-1120).
16. HOFFMANN, L. Criteria for the classification of blue-green algae (cyanobacteria) at the genus and at the species level. 1988, *Hydrobiologie*, 131-139. ISSN. 0188-8897
17. JOHN, D. ; WHITTON, B. The Freshwater Algal Flora of the British Isles'. 2003. ISBN 978-0-521-19375-7
18. LEE, C. G.; PALSSON, B. J. B. ; BIOENGINEERING. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. 1994, **44** (10), 1161-1167. ISSN: 0006-3592.
19. CABALLERO ÁLVAREZ, M. W. "Tecnología para el desarrollo sostenible de viveros de papaya (*Carica papaya* L.)". Universidad Central´´ Marta Abreu´´ de Las Villas. 2012.
20. MARKER, A. J. E. L. Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry, *Arch, Hydrobiol. Beih.* 1980, **14**, 52-69. ISSN 2310-2799
21. STRICKLAND, J. D. H. ; PARSONS, T. R. A practical handbook of seawater analysis. 1972 <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-1791..>
22. WYMAN, M. ; FAY, P. J. P. o. t. R. s. o. L. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria) II. The influence of light quality. *Biological sciences.* 1986, **227** (1248), 381-393. ISSN: 0080-4649.
23. BENNETT, A. ; BOGORAD, L. J. T. J. o. c. b. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology.* 1973, **58** (2), 419. Online ISSN: 1540-8140 .

24. TREDICI, M.; CARLOZZI, P.; ZITTELLI, G. C. ; MATERASSI, R. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource technology*. 1991, **38** (2-3), 153-159. ISSN: 0960-8524.
25. DASH, A. K. ; MISHRA, P. C. Growth response of the blue-green alga, *Westiellopsis prolifica* in sewage enriched paper mill waste water. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 1999, **15** (2), 79-83. ISSN: 0188-4999.
26. LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. ; RANDALL, R., J J Biol Chem. Measurement of protein with the Folin phenol reagent. 1951, **193** (1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
27. MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A.; ISDEPSKY, A. ; SING, S. F. "Standard methods for measuring growth of algae and their composition." En: *Algae for biofuels and energy*. Springer, 2013, p. 265-284. DOI: 10.1007/978-94-007-5479-9_16.
28. LÓPEZ, C. V. G., *et al.* Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. 2010, **101** (19), 7587-7591. ISSN: 0960-8524.
29. RYCKEBOSCH, E.; MUYLEAERT, K. ; FOUBERT. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2012, **89** (2), 189-198. ISSN: 0003-021X.
30. NC-ISO. 2006.
31. KOMAREK, J. ; ANAGNOSTIDIS, K. J. A. f. H. S. M. B. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. 1989, **82** (3), 247-345. ISSN: 0341-2881.
32. WHITTON, B. A. ; POTTS, M. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Springer Science & Business Media, 2007. ISBN 0306468557.
33. TANDEAU DE MARSAC, N. "Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes." En: *The molecular biology of cyanobacteria*. Springer, 1994, p. 825-842. DOI: 10.1007/978-94-011-0227-8_28.
34. DODDS, W. K.; GUDDER, D. A. ; MOLLENHAUER, D. J. J. o. P. The ecology of Nostoc. 1995, **31** (1), 2-18. ISSN: 0022-3646.
35. MEEKS, J. C. ; ELHAI, J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, **66** (1), 94-121. ISSN: 1092-2172.

36. HERDMAN, M. J. B. s. M. o. S. B. Formgenus VIII. Nostoc Vaucher 1803. 2001, **1**, 575-580. ISBN: 978-0-387-95042-6 .
37. WHITTON, B. Introduction to the cyanobacteria. The Ecology of Cyanobacteria (Whitton BA & Potts M, eds). En.: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 2000. ISBN: 978-0-306-46855-1
38. DE PHILIPPIS, R., *et al.* Assessment of the potential of Nostoc strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *Journal of Applied Phycology*. 2000, **12** (3-5), 401-407. ISSN: 0921-8971.
39. WHITTON, B. A. *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 9400738552.
40. CASTENHOLZ, R.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M. ; WILMOTTE, A. 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"2nd edn., eds. Boone DR and Castenholz RW. En.: Springer Verlag, Heidelberg, 2001.
41. GEITLER, L. J. K. v. D., Osterreich und der Schweiz. Cyanophyceae. 1932, **14**, 130-148. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.1356> .
42. SIHVONEN, L. M., *et al.* Strains of the cyanobacterial genera Calothrix and Rivularia isolated from the Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to Gloeotrichia and Tolypothrix. 2007, **61** (1), 74-84. ISSN: 1574-6941.
43. WHITTON, B. J., P. Fay ; BAALEN, C. V. biology of Rivulariaceae. 1987.
44. FUMANTI, B.; ALFINITO, S. ; CAVACINI, P. J. H. Floristic studies on freshwater algae of Lake Gondwana, northern Victoria Land (Antarctica). 1995, **316** (2), 81-90. ISSN: 0018-8158.
45. GUPTA, K. ; BARUAH, P. J. J. A. B. U. Isolation, identification and characterization of rice field Calothrix spp. of Assam. 2017, **8**, 77-81. ISSN: SSN: 2229 – 6905.
46. FLECKER, A. S. ; TAYLOR, B. W. J. E. Tropical fishes as biological bulldozers: density effects on resource heterogeneity and species diversity. 2004, **85** (8), 2267-2278. ISSN: 1939-9170.
47. DILLON, J. G. ; CASTENHOLZ, R. W. J. E. M. The synthesis of the UV-screening pigment, scytonemin, and photosynthetic performance in isolates from closely related natural populations of cyanobacteria (Calothrix sp.). 2003, **5** (6), 484-491. ISSN: 1462-2912.

48. LEWITUS, A. J.; CARON, D. A. ; MILLER, K. R. J. Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae) 1. *Journal of phycology*. 1991, **27** (5), 578-587. ISSN: 0022-3646.
49. BENAVENTE-VALDÉS, J. R., *et al.* "Microbial Technology: Microalgae." En: *Advances in Food Bioproducts and Bioprocessing Technologies*. CRC Press, 2019, p. 57-80. ISBN 0429331819.
50. MASOJÍDEK, J. ; TORZILLO, G. Mass cultivation of freshwater microalgae. 2014. DOI:10.1016/B978-008045405-4.00830-2 .
51. HIRSCHBERG, J. ; CHAMOVITZ, D. "Carotenoids in cyanobacteria." En: *The molecular biology of cyanobacteria*. Springer, 1994, p. 559-579. ISBN 978-94-011-0227-8.
52. LOPES, G.; CLARINHA, D. ; VASCONCELOS, V. J. M. Carotenoids from cyanobacteria: a biotechnological approach for the topical treatment of psoriasis. *Microorganisms*. 2020, **8** (2), 302. doi: 10.3390/microorganisms8020302.
53. LEE, K. N. Appraising adaptive management. *Conservation ecology*. 1999, **3** (2). ISSN: 1195-5449.
54. BRYANT, D. Cyanobacterial phycobilisomes: Progress toward complete structure and function in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *The photosynthetic apparatus: molecular biology and operation*. Academic Press, Boston. 1991, 257-300. ISSN 1313-6577
55. MONCAYO MEDINA, A. E. "Caracterización morfológica, análisis proximal y análisis microbiológico de una muestra de la Cianobacteria *Nostoc* sp., recolectada en el páramo de Papallacta". Quito: UCE. 2017. Repositorio didgital
56. CADENA, M., *et al.* Bioprospección de macrocolonias de *Nostoc* sp. en los andes ecuatorianos. 2013, **36** (2), 287-308. ISSN: 0084-5906.
57. ROSALES-LOAIZA, N.; DÍAZ, L.; AIELLO-MAZZARRI, C.; MORALES-AVENDAÑO, E. J. R. C. C. B. Cultivos a cielo abierto de las cianobacterias *Nostoc* LAUN0015 y *Anabaena* MOF015 para la producción de biomasa enriquecida. Pruebas piloto para cultivos masivos. 2017, **48** (3), 81-86. ISSN: 2221-2450.
58. GOLDEN, J. W. ; YOON, H.-S. J. Heterocyst development in *Anabaena*. *Current opinion in microbiology*. 2003, **6** (6), 557-563. ISSN: 1369-5274.

59. SINGH, P.; KHAN, A. ; SRIVASTAVA, A. "Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria: a view toward cyanobacterial symbiosis." En: *Advances in Cyanobacterial Biology*. Elsevier, 2020, p. 235-248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819311-2.00016-4>

60. EL-SHEHAWY, R. M. ; KLEINER, D. The mystique of irreversibility in cyanobacterial heterocyst formation: parallels to differentiation and senescence in eukaryotic cells. *Physiologia Plantarum*. 2003, **119** (1), 49-55. ISSN: 0031-9317.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Yadenis Ortega Díaz: participó en la concepción general del artículo, en la definición de los métodos y técnicas, la realización de análisis del perfil bioquímico, el procesamiento de la data experimental, análisis estadístico; la escritura del artículo científico, el análisis y discusión de resultados.

Liliana María Gomez Luna: participó en la concepción general de la investigación, participó en la identificación de cianobacterias del consorcio; en el análisis de la data experimental, la redacción del artículo, discusión de los resultados y la revisión final.

Yadira Silveira Font: participó en la determinación del perfil bioquímico; revisión de la redacción y discusión de los resultados.