



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL  
NOROESTE, S. C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA  
DE LA CIANOBACTERIA *Scytonema ocellatum* cepa  
SLC1097-22, EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD  
COMO BIOFERTILIZANTE Y SU CONTRIBUCIÓN  
EN LA RETENCIÓN DE HUMEDAD EN EL SUELO.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en: Biotecnología)

p r e s e n t a

**A z u c e n a   Á l v a r e z   G o n z á l e z**

La Paz, B. C. S., Diciembre 2003

## ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 25 del Mes de Noviembre del 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

**"Optimización de la producción de biomasa de la cianobacteria *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22, evaluación de su capacidad como biofertilizante y su contribución en la retención de humedad en el suelo."**

Presentada por el alumno:

**Azucena Álvarez González**

---

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISION REVISORA

---

Dr. Alejandro López Cortés  
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Enrique Troyo Diéguez  
CO-TUTOR

---

M. en C. Yolanda Maya Delgado  
CO-TUTOR

---

**DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,**  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

Director: Dr. Alejandro López Cortés

Co – Tutor: Dr. Enrique Troyo Diéguez

Co – Tutor: M. en C. Yolanda Maya Delgado

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Enrique Troyo Diéguez

M. en C. Yolanda Maya Delgado

## **JURADO DE EXAMEN**

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Enrique Troyo Diéguez

M. en C. Yolanda Maya Delgado

Suplente: Dr. Bernardo Murillo Amador

## RESUMEN

El presente estudio se desarrolló en cuatro partes: la primera correspondió a la optimización de la producción de biomasa de la cianobacteria *Scytonema (S.) ocellatum* cepa SLC1097-22 proveniente de selva baja caducifolia deteriorada de La Sierra de la Laguna, B.C.S. La segunda y tercera parte correspondieron a la aplicación de *S. ocellatum* en el suelo para evaluar su efecto en la retención de humedad del suelo y liberación de compuestos nitrogenados que sirven como fertilizantes en el cultivo de chile. En la cuarta parte se evaluó la sobrevivencia e integridad de esta cianobacteria aplicada en el suelo.

*S. ocellatum* presentó el crecimiento más rápido bajo las siguientes condiciones: iluminación constante, intensidad luminosa de  $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  en recipientes de vidrio de volúmenes menores a 2 L y  $500 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa en garrafones de 19 L de plástico azul transparente, a  $23^{\circ}\text{C}$ . La retención de humedad en el suelo se evaluó tanto en macetas dentro de una casa sombra como en un campo agrícola experimental. Los resultados indicaron que *S. ocellatum* fue capaz de retener un mayor porcentaje de humedad en el suelo cuando las condiciones ambientales no excedieron los  $30^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa estuvo por encima de 60%. En cuanto al efecto de la liberación de compuestos nitrogenados al suelo como fertilizantes en el cultivo de chiles, no hubo una diferencia significativa en el peso y longitud de los frutos entre los tratamientos con cianobacteria y el control. Sin embargo, se observó un incremento significativo en el contenido de proteína en los tratamientos con *S. ocellatum*, especialmente en aquellos en los que se aplicó la cianobacteria en etapa de plántula. La sobrevivencia e integridad de *S. ocellatum* en el suelo fue diferencial dependiendo de la posición que ocupa en la colonia. Los filamentos del centro se mantuvieron íntegros y verdes mientras que los de la periferia cambiaron su coloración a café o colapsaron y murieron.

Se concluyó que *Scytonema ocellatum* tiene potencial como biofertilizante porque 1) puede incrementar la calidad de las cosechas en cuanto al contenido de proteína, 2) disminuye el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, 3) mantiene por más tiempo el agua del riego y 4) sobrevive cuando menos 2 meses en la superficie del suelo.

Palabras clave: cianobacteria, producción de biomasa, retención de humedad, biofertilizante.

## ABSTRACT

This study was developed in four parts: The first concerned the optimization of biomass production of cyanobacteria *Scytonema ocellatum* strain SLC1097-22, obtained from the tropical dry forest in the Sierra de la Laguna, B.C.S. The second and third parts correspond to application of the cyanobacteria to soil to evaluate its effects on moisture retention and release of nitrogen compounds to the soil to serve as fertilizer in chili cultivation. The fourth part evaluated survival and integrity of cyanobacteria applied to soil.

*S. ocellatum* showed the fastest growth under the following conditions: constant illumination at 23°C at a light intensity of 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  to glass flasks with a volume of less than 2L and at a blue light intensity of 500  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  to transparent 19-L plastic water containers. Moisture retention in soil was evaluated in a greenhouse in planting pots, as well as in the field. Results showed that *S. ocellatum* was able to provide a large percent of moisture-holding capacity to soil, as long as the temperature did not exceed 30°C and the relative humidity was above 60%. The effect of nitrogen compounds released to the soil as a nutrient for chili plants showed no significant difference in weight and length of chili peppers between treatments with cyanobacteria and the control. However, protein content increased in the *S. ocellatum* treatments, especially in those where cyanobacteria were applied at the seedling stage. Survival and integrity of *S. ocellatum* in soil differed, depending on the cyanobacterium's location in the colony. Inner filaments maintained their integrity and remained green while the outer filaments changed their pigmentation to brown or collapsed and died.

This study supports the use of *Scytonema ocellatum* as a biofertilizer because: 1) Crop quality, in terms of protein content was enhanced; 2) Chemical nitrogen fertilizers were reduced, 3) Soil moisture retention improved; and 4) The cyanobacterium survived at least 2 months in top soil.

Key words: cyanobacteria, biomass production, water retention, biofertilizer

**A Dios...**

## AGRADECIMIENTOS

A Instituciones

Antes que nada al CONACyT por la beca No. 166341 otorgada durante dos años.

A la Fundación Produce Baja California Sur A.C. con el proyecto 2435 (2002) “Aplicación de inóculos de cianobacterias fijadoras de nitrógeno (*Scytonema*) para estimular recuperación de suelos”.

A los proyectos de recursos fiscales del CIBNOR: Bive6 (2002) “Producción masiva a escala experimental de *Scytonema*”, ZA3.5 (2003) “Permanencia de *Scytonema*, una cianobacteria pseudoramificada con heterocistos y su importancia en zonas áridas” y 16MV4 (2003) “Escalamiento de la producción de biomasa de la cianobacteria *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 y validación agrícola en cultivo de chile” del Programa de Agricultura de Zonas Aridas y la Dirección de Vinculación y Transferencia Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Alejandro López Cortés.

Al Posgrado del CIBNOR y las bellas mujeres que lo integran (Thelma, Lupita, Bety, Osbelia, Lety, Claudia y Brenda (de eventual).

Al CIBNOR por haberme permitido hacer uso de las instalaciones. Especialmente al Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular (Microbiología IV), por todo todo todo el apoyo.

A todos aquellos investigadores que me dieron clases

A Alejandra Nieto por sus comentarios y tips

A Juan Larrinaga por su conocimiento y tiempo

A Yolanda Maya por su co-dirección y agradable tutoría

A Enrique Troyo por su co-dirección, tiempo y cafecitos

A Alejandro López Cortés por la dirección de este trabajo pero muy en especial por enseñarme con su ejemplo a amar el trabajo, a cuidar y honrar el equipo, a poner atención hasta los más ínfimos detalles, por mostrarme las maravillas de la microbiología, a valorar la experiencia de los demás (en especial la suya), por su paciencia, por compartir y sintetizar sus conocimientos, por todo su apoyo y atención de calidad, por guiarme en este arduo camino de la ciencia y por dejarme ser.

A los técnicos que me echaron la mano

A todos los del edificio J (arriba y abajo), en especial al Laboratorio de Bioquímica, a Ann, a Fernando y todos los chicos que lo habitan (chamaco (Julio), Julio, Juan Carlos, Paty, Mariana, Laura); a Arturo Sánchez, Minerva Cerro por todas tus atenciones, a Tania Castillo por sus muchos tips, al Paquito, Manuel, Angel, Juan Pablo y Luz.

A todos los del edificio M que les di lata: Sonia y Lolita; mi amigo Manuel Trasviña (mil gracias osito), Lupe; Carmen; Norma y Sofi (por todas las autoclaveadas); a Iban por su sonrisa y a Marte por latoso.

A los del edificio H, Lidia, Carmen, Alvaro G. Michel.

A los del Fitoplancton: Mayra Vargas (ya no estas ahí pero gracias por toda tu ayuda), Pedro (tampoco estas ahí pero gracias), Adriana, Julián y Cyntia.

A los del campo agrícola: Juan Vega por tu disposición y franqueza, Pedro (otra vez) y don Amado.



A los del taller de Maquinados y Paileria, especialmente a Memo, por materializar ideas, y a Efraín.

A los chicos de Vinculación y Tránsito Tecnológica (Alfredo, Martín y Abraham) por su amistad y sonrisas.

A Tony y Ana María por su dulzura y por ser tan serviciales.

A los vigilantes (especialmente a Cruz por su sonrisa) y a los chicos de limpieza.

A Ira Fogel por corregir el Abstract tan rápido.

A los compas

A mis 26 compañeros y agregados que han sido mi familia querida durante dos años: Alfonso (Poncho), Alonso, Ana Coyota Mayor, Armando, Arturo (sin palabras, con un nudo en la garganta), Blanquita y Moncho (gracias por sus explicaciones agronómicas), Carlos, Dianita (arriba las Renas!!!), Flavio, Gisela Araña, Honduras alias Roberto (gracias por tus bendiciones), Ibethe Centrífuga, Itzel (ex veci!!), Karina (otra ex veci!!), mi buen Kiko (Franjijco), Laura (por las ricas pláticas e ideas locas), Manuel y Rox, Marlencilla (arriba las Renas!!!), Miguel Araña, Miguel Olivo (Migüelini Pu), la Palomilla, Paty Coyota, el Rafilla, Scaaaaarrryyy!!!, Sionnan y Sergio.

A los cuates Ernesto Torres por su ayuda y consejos y pa' que no diga que no lo mencioné, a Amaury (por su cariño y sinceridad), Laura Rivera, Hector, Vero (por las charlas filosóficas durante la comida), a Manuel Melero y Horacio Sandoval (mil gracias por su ayuda), a los chicos de la generación de arriba y abajo.

A la familia Dévora por hacerme parte de ellos y brindarme de todo corazón ése primer apoyo cuando llegué.

A mi familia por todo su amor y su apoyo incondicional, por estar siempre conmigo donde quiera que esté, por impulsarme a seguir adelante y más lejos.

A todos aquellos que se me están escapando y que han estado a mi lado.

Y sobre todo, gracias a Dios por estar siempre presente en mi vida y manifestarse de una manera muy especial en el amor, apoyo, paciencia y comprensión de Volker. Te amo Schatz.

## CONTENIDO

Lista de figuras.....	i
Lista de tablas.....	iii
Lista de abreviaturas.....	iv
1. Introducción.....	1
2. Justificación.....	6
3. Marco teórico.....	8
3.1 Regiones semiáridas.....	8
3.2 Cortezas microbióticas.....	9
3.2.1 Descripción y nomenclatura.....	9
3.2.2 Diversidad.....	10
3.2.3 Distribución.....	11
3.2.4 Importancia ecológica.....	12
3.3 Cianobacteria <i>Scytonema (S.) ocellatum</i> .....	13
3.3.1 Descripción.....	13
3.3.2 Distribución en el suelo.....	14
3.3.3 Características ecológicas.....	14
3.4 Producción de biomasa.....	15
3.4.1 Medidas de crecimiento microbiano.....	17
3.5 Las cianobacterias en la retención de humedad y partículas de suelo.....	17
3.6 Fijación de nitrógeno.....	19
3.6.1 Fijación biótica de nitrógeno molecular.....	20
3.6.2 Heterocistos.....	21
3.7 Cianobacterias como biofertilizantes.....	23
3.7.1 Aplicación de inóculos.....	26
3.8 Valoración agrícola de <i>S. ocellatum</i> en Chile.....	26
3.9 <i>Capsicum annum</i> L. ....	27
3.9.1 Aplicaciones del Chile.....	29
4. Hipótesis.....	30
4.1 Hipótesis de la optimización de la producción de biomasa.....	30
4.2 Hipótesis de retención de humedad.....	30
4.3 Hipótesis de valoración agrícola.....	30
4.4 Hipótesis de sobrevivencia de <i>S. ocellatum</i> en suelo.....	31
5. Objetivo general.....	32
5.1 Objetivos particulares.....	32
6. Metodología.....	33
6.1 Optimización de la producción de biomasa de <i>S. ocellatum</i> .....	33
6.1.1 Inóculo.....	33
6.1.2 Medio de cultivo.....	33
6.1.3 Medidas de crecimiento.....	34
6.1.4 Recambio del medio de cultivo (cultivo en sistema de agitación).....	38
6.1.5 Incubación con diferentes concentraciones de fuentes de nitrógeno.....	38
6.1.6 Cultivo en sistema de aireación.....	39
6.1.7 Escalamiento.....	39

6.1.8	Cinética de crecimiento en garrafones de 19 L.....	39
6.2	Retención de humedad.....	40
6.2.1	Retención de humedad en macetas.....	40
6.2.2	Retención de humedad en el campo.....	41
6.2.3	Parámetros visuales.....	43
6.3	Valoración agrícola de <i>S. ocellatum</i> en cultivo de chile.....	43
6.3.1	Cultivo en chiles.....	43
6.3.2	Mediciones de la planta de chile.....	44
6.4	Determinaciones químicas y físicas del suelo.....	45
6.4.1	Amonio.....	45
6.4.2	Textura por el método de Bouyocus.....	46
6.5	Sobrevivencia e integridad de <i>S. ocellatum</i> en el suelo.....	47
6.6	Análisis estadísticos.....	48
7.	Resultados.....	49
7.1	Optimización de la producción de biomasa de <i>S. ocellatum</i> .....	49
7.1.1	Medidas de crecimiento.....	49
7.1.2	Factores que afectan la velocidad de crecimiento.....	52
7.1.3	Escalamiento.....	56
7.2	Efectos de <i>S. ocellatum</i> en la retención de humedad.....	61
7.2.1	Retención de agua y partículas de suelo por <i>S. ocellatum</i> .....	61
7.2.2	Retención de humedad en macetas.....	62
7.2.3	Retención de humedad en campo.....	63
7.2.4	Contenido de amonio y nitrato en el suelo.....	64
7.2.5	Temperatura del suelo en campo.....	64
7.3	Valoración agrobiológica de <i>S. ocellatum</i> en plantas de chile.....	66
7.3.1	Contenido de clorofila total en hojas de chile.....	66
7.3.2	Contenido de proteína en frutos de chile.....	67
7.3.3	Frutos de chile.....	71
7.3.4	Contenido de amonio en el sustrato.....	72
7.4	Sobrevivencia, integridad y reactivación de <i>S. ocellatum</i> en el suelo.....	73
7.4.1	En cultivo de chiles en macetas.....	73
7.4.2	En campo.....	78
7.4.3	Reactivación y almacenamiento.....	78
8.	Discusión.....	80
8.1	Optimización de la producción de biomasa de <i>S. ocellatum</i> .....	80
8.1.1	Medidas de crecimiento.....	80
8.1.2	Factores que afectan la velocidad de crecimiento.....	82
8.1.3	Escalamiento.....	87
8.2	Retención de humedad.....	90
8.2.1	Retención de humedad y de partículas de suelo de <i>S. ocellatum</i> .....	90
8.2.2	Retención de humedad en suelo contenido en macetas.....	90
8.2.3	Retención de humedad en suelo de campo agrícola.....	92
8.2.4	Contenido de amonio y nitrato en el suelo.....	93
8.2.5	Temperatura del suelo.....	93
8.3	Valoración agrobiológica de <i>S. ocellatum</i> en plantas de chiles.....	94

8.3.1 Contenido de clorofila total.....	94
8.3.2 Contenido de proteína en frutos de chile.....	94
8.3.3 Frutos de chile.....	97
8.3.4 Contenido de amonio en suelo de macetas.....	98
8.4 Sobrevivencia, integridad y reactivación de <i>S. ocellatum</i> .....	98
8.4.1 En cultivo de chiles en suelo contenido en macetas.....	98
8.4.2 En campo.....	99
8.4.3 Reactivación y almacenamiento.....	100
9. Conclusiones.....	101
9.1 Optimización de la producción de biomasa de <i>S. ocellatum</i> .....	101
9.2 Retención de humedad.....	102
9.3 Valoración agrobiológica de <i>S. ocellatum</i> en plantas de chile.....	102
9.4 Sobrevivencia, integridad y reactivación de <i>S. ocellatum</i> en el suelo.....	103
10. Bibliografía citada.....	104
Anexo I. Heterocistos.....	117
Anexo II. <i>Capsicum annuum</i> L. ....	123
Anexo III. Medio de cultivo Z8 <sup>0</sup> .....	129
Anexo IV. Solución fertilizante Hoagland.....	131
Anexo V. Sumario de experimentos de producción de biomasa.....	132
Anexo VI. Análisis estadísticos.....	137
Anexo VII. Propuesta de artículos.....	146

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> A: Filamentos de <i>S. ocellatum</i> mostrando pseudoramificaciones. B: la flecha señala un heterocisto intercalar.....	13
<b>Figura 2.</b> Heterocistos de <i>S. ocellatum</i> , presentando coloración amarilla, mayor tamaño que las células vegetativas y los poros que los unen con las células adyacentes.....	22
<b>Figura 3.</b> Pasos y niveles del escalamiento de la producción de biomasa de <i>S. ocellatum</i> .....	40
<b>Figura 4.</b> Disposición de los tratamientos de retención de humedad en el campo.....	42
<b>Figura 5.</b> Gráficas de correlación de las medidas de crecimiento de biomasa de <i>Scytonema</i> .....	50
<b>Figura 6.</b> Diámetro y número de colonias de <i>S. ocellatum</i> incubadas en matraces de 500 mL bajo tres tratamientos de recambio de medio de cultivo.....	51
<b>Figura 7.</b> Velocidad de crecimiento poblacional (K) bajo tres tratamientos de porcentaje de recambio en matraces de 500 mL con medio de cultivo Z8 <sup>0</sup> .....	52
<b>Figura 8.</b> Cinéticas de crecimiento de los cultivos de <i>S. ocellatum</i> bajo 3 tratamientos de porcentaje de recambio del medio de cultivo Z8 <sup>0</sup> .....	53
<b>Figura 9.</b> Velocidad de crecimiento poblacional (K) de <i>S. ocellatum</i> en cuatro tiempos de incubación.....	57
<b>Figura 10.</b> Producción máxima de biomasa de volumen celular empaquetado en fotorreactores de 1L.....	58
<b>Figura 11.</b> Cinética de Crecimiento de <i>S. ocellatum</i> en Garrafrones de 19 L con medio Z8 <sup>0</sup> .....	60
<b>Figura 12.</b> Cultivo de <i>S. ocellatum</i> en garrafrones de 19 L en sistema de aireación.....	60
<b>Figura 13.</b> Lámina de <i>S. ocellatum</i> seca e hidratada.....	61
<b>Figura 14.</b> Lámina de <i>Scytonema</i> con partículas de suelo adheridas en la superficie.....	62
<b>Figura 15.</b> Partículas de suelo atrapadas en filamentos de <i>Scytonema</i> .....	62
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de retención de humedad en suelos tratados con diferentes densidades de <i>S. ocellatum</i> contenida en macetas.....	63
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de humedad del suelo tratado con diferentes coberturas orgánicas.....	64
<b>Figura 18.</b> Comparación de temperaturas del suelo a distintos niveles, bajo tratamientos de coberturas orgánicas.....	65
<b>Figura 19.</b> Clorofila total en hojas de chile crecidos bajo 4 combinaciones de sustrato y riego.....	66
<b>Figura 20.</b> Clorofila total en hojas de chile crecidos en 6 tratamientos de aplicación de <i>Scytonema</i> y cuatro combinaciones de sustrato y riego.....	67
<b>Figura 21.</b> Efecto de la concentración de <i>Scytonema</i> en el porcentaje de proteína de frutos de chile crecidos en 2 tipos de sustrato (Sunshine y Mixto) y riego (Fertilizante y Agua).....	68

<b>Figura 22.</b> Efecto de la concentración de <i>Scytonema</i> en el porcentaje de proteína cuando se aplica en sustrato 100% orgánico (Sunshine) y 30% orgánico + 70% franco arenoso (Mixto).....	69
<b>Figura 23.</b> Efecto de la concentración de <i>Scytonema</i> en el porcentaje de proteína cuando se riega con Fertilizante y Agua.....	69
<b>Figura 24.</b> Efecto de la interacción de las variables riego, sustrato y aplicación de <i>Scytonema</i> en el porcentaje de proteína en los frutos de chile.....	70
<b>Figura 25.</b> Amonio en sustrato mixto regado con fertilizante e inoculado con <i>Scytonema</i> , a 2 profundidades: 0-5 y 5-15 cm.....	72
<b>Figura 26.</b> <i>S.ocellatum</i> con heterocisto (40X) aplicada en 100% sustrato orgánico Sunshine #3.....	73
<b>Figura 27.</b> <i>Scytonema</i> en el tracto digestivo de un Invertebrado .....	74
<b>Figura 28.</b> Filamentos del exterior de las colonias de <i>S. ocellatum</i> después de 2 meses de ser inoculadas en suelo. ....	75
<b>Figura 29.</b> Filamentos del exterior de las colonias de <i>S.ocellatum</i> en donde se muestra una pigmentación café. ....	75
<b>Figura 30.</b> Filamentos del interior de las colonias de <i>S.ocellatum</i> . ....	76
<b>Figura 31.</b> Comunidad de cianobacterias autóctonas del suelo del Campo Agrícola Experimental del CIBNOR, Comitán, BCS.....	77
<b>Figura 32.</b> Micrografía de estereomicroscopio que muestra colonias de <i>Scytonema</i> inoculadas en campo.....	78
<b>Figura 33.</b> Lámina seca de <i>S. ocellatum</i> de 4.54 gr.....	79
<b>Figura 34.</b> Tamaño de las colonias de <i>S. ocellatum</i> bajo condiciones de aireación.....	80
<b>Figura 35.</b> Proceso de fijación de nitrógeno en un heterocisto.....	122

## Lista de Tablas

<b>Tabla I</b> Uso biotecnológico potencial de <i>Scytonema</i> a partir de sus características biológicas.....	16
<b>Tabla II.</b> Valores de correlación entre distintas medidas de crecimiento.....	49
<b>Tabla III.</b> Producción de biomasa seca de <i>S. ocellatum</i> incubada en medio de cultivo Z8 con 3 diferentes proporciones de compuestos nitrogenados.....	54
<b>Tabla IV.</b> Dos sistemas de cultivo: agitación y aireación. ....	55
<b>Tabla V.</b> Condiciones de incubación de cultivos de <i>S. ocellatum</i> .....	56
<b>Tabla VI.</b> Valores de la relación volumen celular empaquetado-volumen del medio de cultivo en mL.....	58
<b>Tabla VII.</b> Velocidad de crecimiento (K) y tiempo de generación (tg) en matraces de diferente capacidad volumétrica. ....	59
<b>Tabla VIII.</b> Mediciones en frutos de chile crecidos en 4 combinaciones de sustrato y riego...	71



### Lista de Abreviaciones

<b><math>\mu</math></b>	Velocidad instantánea de crecimiento poblacional
<b><math>\mu E</math></b>	Micro Einstein
<b>Flora</b>	Aplicación de <i>Scytonema</i> en etapa de floración
<b>g</b>	Gramos
<b>hrs.</b>	Horas
<b>K</b>	Velocidad constante de crecimiento poblacional (días <sup>-1</sup> )
<b><i>MixAgua</i></b>	Sustrato mixto (30%-70% sustrato Sunshine-suelo franco arenoso) regado con Agua
<b><i>MixFert</i></b>	Sustrato mixto (30%-70% sustrato Sunshine-suelo franco arenoso) regado con fertilizante
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno molecular o atmosférico
<b>Nasa</b>	Nitrogenasa
<b>Plant</b>	Aplicación de <i>Scytonema</i> en etapa de plántula
<b><i>SunAgua</i></b>	Sustrato Sunshine regado con Agua
<b><i>SunFert</i></b>	Sustrato Sunshine regado con Fertilizante
<b>tg</b>	Tiempo de generación (días)
<b>VCE</b>	Volumen Celular Empaquetado (mL)

## 1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 18% de la superficie de tierra firme del planeta posee regiones semiáridas en las cuales se asienta el 16% de la población mundial (UNSO, 1997 en Sivakumar y Glinni, 2002). Las tasas de crecimiento de las poblaciones en estas regiones son altas y es en ellas en donde se encuentran la mayoría de las zonas rurales marginadas en el mundo. En general son áreas con baja productividad agrícola y recursos naturales degradados, por lo que existe la necesidad de desarrollar estrategias efectivas para mejorar y sustentar la productividad agrícola (Sivakumar y Glinni, 2002).

Las regiones semiáridas se caracterizan por el régimen irregular y variable de lluvia, tanto espacial como temporalmente y por sus suelos relativamente pobres en nutrientes debido a que los fenómenos de desintegración y descomposición química de la materia orgánica no se manifiestan si el agua no está presente (Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990). Esta variabilidad de lluvia determina en gran medida el tipo de cultivo, por lo que es importante encontrar estrategias de manejo adecuadas para el suelo y el agua que incrementen y sostengan altos niveles de productividad de las cosechas en regiones semiáridas (Sivakumar y Glinni, 2002).

Los compuestos nitrogenados son un factor limitante para el crecimiento y la producción de biomasa de las cosechas; la aportación de estos compuestos al suelo permite cultivos extensivos (Guerrero, 2002; Anónimo 1, 2003).

A pesar de que el nitrógeno es muy abundante en el planeta (constituye el 79% de los gases en la atmósfera y se encuentra en las rocas ígneas y sedimentarias), la forma en que se encuentra este elemento no puede ser asimilado por las plantas (Anónimo 1, 2003; Beltrán Morales, 2003; Delwiche, 1972; Guerrero, 2002). El nitrógeno atmosférico ( $N_2$ )

tiene que ser fijado, es decir, tiene que combinarse con hidrógeno (amonio  $\rightarrow$   $\text{NH}_3$ ) u oxígeno (nitrato  $\rightarrow$   $\text{NO}_3$ ) para que pueda ser asimilado por las plantas superiores (Delwiche, 1972).

El nitrógeno atmosférico puede ser fijado de tres maneras diferentes: (1) abióticamente: combina el nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) con otros compuestos mediante la energía generada de la actividad volcánica, la radiación ionizante y las descargas eléctricas. Esta fuente representa del 10 al 20% de la cantidad total de N fijado biológicamente en el planeta; (2) bióticamente: se presenta en algunos cuantos géneros de bacterias y arqueas de vida libre y simbioses que mediante la enzima nitrogenasa, a temperaturas y presiones normales, logran convertir el  $\text{N}_2$  en amonio que posteriormente se convertirá en proteína. Estos microorganismos son parte esencial del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Anónimo 1, 2003; Guerrero, 2002; Vaishampayan *et al.*, 2001) y, (3) sintéticamente: se fija artificialmente por el hombre mediante el proceso Haber-Bosch, que requiere altas temperaturas y presiones que se consiguen empleando combustible fósil. Desde 1950 la cantidad de N fijado anualmente iguala la cantidad que fue fijada por todos los ecosistemas terrestres antes de la aparición de la agricultura moderna (Delwiche, 1972)

Con la creación de la industria de fertilizantes se ha solucionado el problema de la insuficiencia de compuestos nitrogenados para mantener cultivos extensivos. Sin embargo esta industria demanda un alto costo energético, de transportación y de materia prima, genera altos costos económicos y ecológicos que desde los años 50's han estado produciendo alteraciones en los ciclos biogeoquímicos del planeta (Delwiche, 1972; Guerrero, 2002). Se estima que en el futuro la energía va a ser el factor limitante para el

incremento de la producción agrícola debido a los altos costos de generación de energía (Anónimo 1, 2003). En años recientes se han estado buscando métodos alternativos de fertilización orgánica que aporten nutrientes y microorganismos que mejoren las condiciones del suelo para las plantas. Dentro de estos métodos se han empleado composta, abonos verdes (leguminosas), guano, estiércol, humus de lombriz y biofertilizantes.

El termino “bio” significa *vivo*, por lo que bio-fertilizante se refiere a microorganismos benéficos seleccionados que se adicionan al suelo para incrementar el crecimiento de las plantas mediante el suministro de nutrientes (Titus y Pereira, 2003). Estos microorganismos pueden hacer una contribución significativa en el desarrollo de estrategias para aumentar la productividad agrícola sin que esto conlleve a un incremento exponencial del consumo de energía no renovable (Anónimo 1, 2003).

Las ventajas de los biofertilizantes son: (1) requieren menos energía que la industria de fertilizantes; (2) menor costo de transporte y materia prima; (3) son amigables con el ambiente; (4) incrementan la biodiversidad; (5) no contaminan el ecosistema; (6) no interfieren en la cadena alimenticia; (7) son multifuncionales, ya que los biofertilizantes no sólo proveen los nutrientes requeridos por las plantas sino que también mejoran las propiedades físicas y químicas del suelo, y (8) el uso prolongado de biofertilizantes incrementa la productividad del suelo al menos en un 10% (Anónimo 1, 2003).

Los biofertilizantes comercialmente disponibles son: (a) cianobacterias de vida libre fijadoras de  $N_2$  con heterocistos; (b) *Azolla*, liquen compuesto por hongo y cianobacteria; (c) *Rhizobium*, bacteria simbiótica de leguminosas que fija  $N_2$ ; (d) *Azotobacter*, bacteria de vida libre fijadora de nitrógeno que produce sustancias promotoras del crecimiento de las plantas; (e) *Azospirillum*, bacteria relacionada con las raíces de las plantas, fijadora de

nitrógeno que estimula el crecimiento de las plantas y la producción de hormonas, y (f) Micorrizas, hongos asociados a raíces de plantas (Anónimo 1, 2003; Kalininskaya *et al.*, 1989; Titus y Pereira, 2003).

Las cianobacterias que se han utilizado como biofertilizantes son aquellas que poseen la capacidad de fijar N<sub>2</sub> ya sea mediante una asociación simbiótica con hongos como Azolla-Anabaena que en promedio fijan arriba de 600 kg N ha<sup>-1</sup> en campos inundados de arroz (Vaishampayan *et al.*, 2001) o mediante células diferenciadas llamadas heterocistos como las de los géneros Nostocales y Stigonematales (Castenholz *et al.*, 2001; Fay, 1983) que en promedio contribuyen con 20-30 kg N ha<sup>-1</sup> en zonas áridas y semiáridas (Vaishampayan *et al.*, 2001). Se han establecido más de 100 especies de cianobacterias con heterocistos como eficientes fijadoras de N<sub>2</sub> (Venkataraman, 1993 en Vaishampayan *et al.*, 2001), algunas de ellas se han empleado como biofertilizante en cultivos de arroz principalmente (Vaishampayan *et al.*, 2001), de café (Titus y Pereira, 2003), en trigo y maíz (Zulpa de Caire y Palma, 1999), chile y tomate (López Cortés, 2003; López Cortés *et al.*, 2001b, López Cortés y Maya Delgado, 2003).

En México, el chile tiene una gran importancia económica, representa el 8.6% de la exportación total de productos hortícolas y su producción asciende a 970,000 toneladas (Corona Torres *et al.*, 2002). El cultivo de chile se ha extendido alrededor del mundo; incluso en países como China, España, Turquía, Estados Unidos, India, Nigeria, Hungría y Yugoslavia, esta hortaliza alcanza volúmenes de producción muy superiores a los de los países productores de donde es originario (Ramírez, 2002).

En años recientes, Maya *et al.* (2002) aislaron de suelos erosionados de selva baja caducifolia de la Sierra de la Laguna, Baja California Sur, México, una cianobacteria

filamentosa con heterocistos llamada *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22. Esta cepa fue utilizada por López Cortés *et al.* (2001b, 2003) como biofertilizante en cultivos de jitomate y chile. Los resultados que obtuvieron revelaron que la aplicación de esta cianobacteria en el cultivo de chiles en bolsas, incrementa la longitud y biomasa de los frutos de chile.

De acuerdo con los resultados que obtuvieron López Cortés *et al.* (2001b, 2003), se planteó este proyecto como un acercamiento para valorar las ventajas agroecológicas que presenta *Scytonema ocellatum* en cuanto a que ayuda a mejorar las características físicas y químicas del suelo. El presente trabajo se desarrolló en 4 partes principales: la primera corresponde a la optimización de la producción de biomasa de *Scytonema ocellatum* bajo diferentes temperaturas, intensidades y periodos de luz, recambio del medio de cultivo y volúmenes de biorreactores. La segunda parte corresponde a la verificación de las propiedades de *Scytonema ocellatum* en cuanto a retención de humedad y partículas de suelo. La tercera parte fue la utilización de la biomasa de *Scytonema ocellatum* en cultivo de chile ancho en macetas con 2 tipos de sustrato y 2 tipos de riego. La cuarta parte corresponde a la valoración de la sobrevivencia y viabilidad de los inóculos de *S. ocellatum* en el suelo, tanto en maceta como en el campo.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La política nacional de las instituciones que generan conocimiento es el promover el desarrollo de paquetes tecnológicos, basados en estudios científicos, que mejoren el nivel de competitividad del país a nivel global. La generación de los paquetes tecnológicos está formado por un ciclo de 3 etapas principales: a) investigación básica; b) investigación experimental o aplicada; y c) desarrollo experimental (Manual de Frascati, 1993). El presente proyecto es una contribución a las dos primeras etapas del ciclo que corresponde a la generación de conocimiento sobre tres vertientes del uso de inóculos de *Scytonema ocellatum* en el suelo: 1) mejorador de las propiedades físicas del suelo, 2) mejorador de las propiedades químicas del suelo, y 3) benefactor en cultivos agrícolas.

En México, el 33.43% de su territorio es semiárido (Challenger, 1998; Lopez Torres, 1995; Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990) en el cual el contenido de nutrientes esenciales en el suelo, como los compuestos nitrogenados, son escasos. Baja California Sur, es el estado que presenta el porcentaje de materia orgánica y nitrógeno aprovechable más bajos del país, 0.5% y 14.2% respectivamente (Ojeda Ortega, 1974 en: Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990). Aunado a esto, la baja precipitación pluvial, con un promedio que oscila entre 100 y 200 mm PPMTA, y el clima muy seco (INEGI, 2002a), no favorecen a la región como una zona agrícola, sin embargo el 9.3% de su territorio se cultiva (INEGI, 2002b).

Uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia en el estado es el chile (*Capsicum annum* L) el cual ocupa el primer lugar en superficie sembrada en algunos municipios de La Paz (García Hernández, 2001), a nivel nacional este cultivo representa el 8.6% de la exportación total de productos hortícolas (Corona Torres *et al.*, 2002). Sin embargo, el

nivel de tecnología que se emplea hace que los costos de producción sean altos y que difícilmente puedan competir en el mercado (Ramírez, 2002). Una parte importante de los costos de producción esta en el empleo de fertilizantes químicos. Para obtener una buena cosecha de chiles, el cultivo requiere de 300 kg de N/ha (Sakata Seed de México, 2002). En años recientes la agricultura orgánica ha cobrado importancia en la región debido a dos causas principales: 1) a la mayor rentabilidad que tienen los cultivos, en especial las hortalizas que son para exportación y, 2) la práctica de la agricultura orgánica permite un mejor aprovechamiento de los insumos y recursos invertidos en la misma (Nieto Garibay, 2000).

La cianobacteria *Scytonema ocellatum*, ya ha sido probada como biofertilizante en cultivo de chiles resultando en el incremento en longitud y peso de los frutos (López Cortés *et al.*, 2001b; López Cortes y Maya Delgado, 2003). Esta cianobacteria fija N<sub>2</sub> en presencia de humedad y lo convierte en amonio que después libera al suelo, una vez ahí, las plantas pueden absorber el amonio y transformarlo en proteína (Harper y Pendleton, 1993) que se ve reflejada en la talla y peso de los frutos. El resultado es una buena cosecha que ahorra fertilizantes sintéticos y le da el valor agregado de ser un cultivo orgánico con el cual puede competir en el mercado internacional.

Por lo anterior, se planteó el presente proyecto como un tercer acercamiento en la validación agrobiológica de *Scytonema ocellatum* en el cultivo de chile, y como un primer acercamiento de esta cianobacteria como un organismo que mejora las propiedades físicas y químicas del suelo.



### **3. MARCO TEORICO**

#### **3.1 Regiones semiáridas**

Por lo general, las regiones semiáridas constituyen una zona de transición entre el desierto o regiones áridas y las regiones sub-húmedas y húmedas, se caracterizan por tener un corto e irregular periodo de lluvias durante el año, de 3 a 5 meses, que lo distingue de las regiones áridas, alta radiación solar y temperaturas elevadas (Sivakumar y Glinni, 2002).

Las regiones semiáridas del norte de África, sur de Australia, sur de Irán, oeste de Asia, noroeste de México y partes adyacentes del suroeste de USA, están dominados por los vientos del oeste, los ciclones y los frentes de viento. La lluvia en las regiones semiáridas ha sido caracterizada no solo por su comportamiento promedio sino por la variabilidad interanual, interestacional y espacial. En años de poca lluvia, puede ocasionar sequía, en años de intensa lluvia o incluso durante años de periodos cortos de lluvia, pero intensa, puede ocasionar inundación. También puede suceder que en los años de poca lluvia sean precedidos por años de lluvia intensa (Sivakumar y Glinni, 2002).

El impacto de la precipitación pluvial baja y variable en las regiones semiáridas está determinado por el tipo de suelo y sus propiedades físicas y químicas. El suelo Arenosol es un suelo común en estas regiones, la textura de este tipo de suelo contiene más de 65% de arena y menos del 18% de arcilla. Los arenosoles se caracterizan por la baja fertilidad y baja capacidad de retención de agua (Sivakumar y Glinni, 2002).

El tipo de suelo en el estado de Baja California Sur es Yermosol Háptico que se distingue por tener una capa superficial de color claro, muy pobre en materia orgánica y textura franco arenosa, con fase química ligeramente alcalina en algunos sitios (Naranjo, 1994 en

Nieto Garibay, 2000). El promedio de precipitación pluvial anual varía entre 100 y 200 mm, una de las más bajas del país (INEGI, 2002a). La baja precipitación, alta evaporación y altas temperaturas son las limitantes más críticas para las actividades agrícolas en el Estado (Nieto Garibay, 1994).

Para solucionar el problema de la escasez de agua en el Estado se han buscado diversas soluciones como utilizar plantas desaladoras de diesel y de energía solar para utilizar el agua marina (Nieto Garibay, 1994), acondicionadores de suelo que retienen la humedad, utilización de mantillo en la superficie del suelo, sistemas de riego tecnificado, etc. Donde en cualquier caso, se pretende lograr el mayor rendimiento con el menor gasto de insumos, entre ellos el agua dulce.

Estudios recientes indican que la lluvia *per se* no es necesariamente el factor limitante crucial para la producción agrícola. Mas bien, es la proporción de lluvia que entra en el reservorio del suelo y que es utilizada subsecuentemente por las plantas (Sivakumar y Glinni, 2002), por lo que el desarrollo de alternativas que ayuden a compatibilizar la conservación del agua dulce en los cultivos se muestra como una necesidad en las regiones donde el agua es escasa.

## **3.2 Cortezas Microbióticas**

### ***3.2.1 Descripción y nomenclatura***

Las cortezas microbianas son comunidades de organismos compuestos por líquenes, hongos, musgos, cianobacterias, algas, bacterias y protozoarios (Evans y Johansen, 1999). Se han usado varios términos para referirse y describir las cortezas biológicas del suelo

tales como criptogámicas y microflora en 1972 por Kleiner y Harper (en Evans y Johansen, 1999), microfítica en 1990 por West (en Evans y Johansen, 1999), criptobiótica por Belnap en 1993 y microbiótica por St. Clair y Johansen en el mismo año (Evans y Johansen, 1999; St. Clair y Johansen, 1993). Los términos microflora y microfítica se refieren a plantas y por lo tanto ignoran a los hongos y bacterias que son componentes importantes de las cortezas biológicas. La palabra “criptobiótico” significa “biota escondida u oculta”, lo cual no es aplicable para todos los grupos de organismos presentes en las cortezas ya que algunos de ellos se encuentran en la parte superficial del suelo (epiedáficas). Criptogámica se refiere a plantas que se reproducen por esporas más que por semillas, y en el tiempo en el que éste término fue acuñado se incluyeron las plantas vasculares criptogámicas, briofitas, líquenes, hongos y algas procarióticas y eucarióticas, en la actualidad los últimos tres grupos no son considerados como plantas, por lo que el término es técnicamente incorrecto (Evans y Johansen, 1999). En este trabajo se emplea el término cortezas microbióticas empleado por St. Clair y Johansen (1993) porque engloba a todos los microorganismos que componen las cortezas biológicas.

### **3.2.2 Diversidad**

Entre los microorganismos que conforman las cortezas microbióticas se encuentran las cianobacterias. En general, la diversidad de cianobacterias en las cortezas no es muy grande. Según Rippka *et al.* (1979 en Verrecchia *et al.*, 1995) están compuestas esencialmente por el grupo LPP (*Lyngbya*, *Plectonema*, *Phormidium*) acompañadas por formas heterocísticas (*Nostoc*, *Anabaena*, *Scytonema*), *Oscillatoriales* y especies unicelulares; Evans y Johansen (1999) mencionan que aparentemente hay algunas especies

cosmopolitas dominantes en las cortezas microbióticas: *Microcoleus vaginatus*, *Nostoc commune* y *Schizothrix calcicola*; Stewart (1974 en DuBois y Kapustka, 1983) menciona que en suelos secos vírgenes, los géneros más comunes son *Fishelrella*, *Nostoc*, *Tolypothrix* y *Scytonema*, mientras que en suelos cultivados *Cylindrospermum* y *Anabaena* son los más frecuentemente encontrados. La microbiota de cianobacterias varía de un sitio a otro (DuBois y Kapustka, 1983; Verrecchia *et al.*, 1995).

### **3.2.3 Distribución**

Las cianobacterias de las cortezas microbióticas se pueden encontrar en una gran diversidad de ecosistemas incluyendo ambientes mésicos, pastizales, desiertos tropicales y templados y regiones polares (Eldridge y Green, 1994 en Evans y Johansen, 1999; Fay, 1983) y han sido estudiados en todo el mundo: Estados Unidos (Belnap *et al.*, 1993; Dubois y Kapustka, 1983; García Pichel *et al.*, 2001; Jeffries *et al.*, 1992; Johansen y Rushforth, 1985; St. Clair *et al.*, 1984); Israel (García Pichel *et al.*, 2001; Verrecchia *et al.*, 1995); México (García Pichel *et al.*, 2001; López Cortés *et al.*, 2001a; Maya *et al.*, 2002); Australia (Eldridge y Leys, 2003); French West Indies (Fritz Sheridan, 1986); España (García Pichel *et al.*, 2001; García Pichel y Pringault, 2001); el sureste de África (Aranibar *et al.*, 2003) Sin embargo, estas cortezas se desarrollan mejor en zonas áridas, semiáridas y parches abiertos de bosques (Aranibar *et al.*, 2003; Verrecchia *et al.*, 1995, García Pichel *et al.*, 2001) en donde la escasa disponibilidad de agua limita el crecimiento de plantas superiores las cuales reducen la radiación solar directa en el suelo (Metting, 1991 en Evans y Johansen, 1999).

### 3.2.4 Importancia ecológica

Las cortezas microbióticas son importantes para la dinámica de los recursos en muchos ecosistemas áridos (Belnap *et al.*, 1993; St. Clair *et al.*, 1984) ya que: (1) Las cortezas biológicas del suelo que se desarrollan bajo estas condiciones representan una capa fotosintética continua en los espacios entre las plantas (Lange *et al.*, 1992 en Evans y Johansen, 1999) y pueden llegar a representar hasta un 70% de la cobertura viva de un ecosistema (Belnap *et al.*, 1993); (2) atrapan partículas de suelo, lo que incrementa significativamente la estabilidad de la superficie del suelo y la resistencia a la erosión hídrica y eólica (Belnap, 1993; Belnap y Harper, 1994; Eldridge y Leys, 2003; Evans y Johansen, 1999; Maya *et al.* 2002; St. Clair *et al.*, 1984); (3) ayudan a retener la humedad en el suelo (Belnap, 1993 ; Eldridge y Leys, 2003), hinchando varias veces su tamaño original (Campbell *et al.*, 1989 en Aranibar, 2003) y pueden absorber varias veces su peso en agua (Verrecchia *et al.*, 1995); (4) incrementan la agregación y actúan como reserva de nutrientes inorgánicos que de otra manera podrían estar lixiviándose (Belnap *et al.*, 1993; Belnap y Harper 1994; Harper y Pendelton, 1963); (5) pueden tener una influencia significativa en la dinámica del carbono de los ecosistemas áridos porque muchos de los organismos dominantes son capaces de fotosintetizar (Alexander, 1980; Evans y Johansen, 1999), incluso Lange *et al.* (citado en Evans y Johansen, 1999) sugieren que la tasa fotosintética de las cortezas puede superar el 20% de las observadas en las plantas superiores; (6) fijan nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) y producen compuestos nitrogenados que se liberan en el suelo vía descomposición y secreción celular y estimulan el desarrollo de las plantas (Alexander, 1980; Belnap *et al.*, 1993; Belnap *et al.*, 2001; Belnap y Harper, 1994; Evans y Johansen, 1999); y (7) incrementan el establecimiento de semillas y la

sobrevivencia de varias especies (Belnap, 1993 ; Evans y Johansen, 1999; Harper y Pendleton, 1993; Maya *et al.* 2002; St. Clair *et al.*, 1984; Storni *et al.*, s/A) por lo que estas cortezas pueden tener una gran importancia agronómica.

### 3.3 Cianobacteria *Scytonema ocellatum*

#### 3.3.1 Descripción

*Scytonema ocellatum* es una cianobacteria fotoautótrofa que pertenece a la Orden *Nostocales*; es de vida libre, crece de forma filamentosa pseudoramificada (Figura 1a), sus filamentos a veces están libres y otras en manojos (Castenholtz *et al.*, 2001; Geitler, 1932; Hoffman y Asencio, 1999; Maya *et al.*, 2002), desarrollan heterocistos generalmente intercalares (Figura 1b), que son células diferenciadas capaces de fijar N<sub>2</sub> (ver explicación más adelante), los hormogonios se desarrollan en el extremo del tricoma, el filamento mide de 10 a 18 µm de diámetro y presenta exopolisacáridos (Geitler, 1932), su forma de reproducción es por fisión binaria (Fay, 1983).



Figura 1. A: Filamentos de *Scytonema ocellatum* mostrando pseudoramificaciones. B: la flecha señala un heterocisto intercalar.

### 3.3.2 Distribución en el suelo

La mayoría de las cortezas de algas y cianobacterias se encuentran generalmente en el primer centímetro de suelo (endodáficas), el único taxón que se encuentra normalmente en la superficie del suelo (epiedáfico) de las zonas áridas y semiáridas es *Nostoc* (Evans y Johansen, 1999). La cianobacteria *Scytonema* sp. se ha reportado en la superficie de cortezas de desiertos fríos como Colorado Plateau y el sureste de Utha en U.S.A. (Belnap, *et al.*, 1993; Bowker *et al.*, 2002; García Pichel y Belnap, 1996; García Pichel *et al.*, 2001; Jeffries *et al.*, 1992); en lechos volcánicos en French West Indies (Fritz Sheridan, 1986); en campos de arroz en Argentina (Storni *et al.*, s/A) y selva baja caducifolia en México (Maya *et al.*, 2002).

### 3.3.3 Características ecológicas

La cianobacteria *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22, fue aislada de selva baja caducifolia de la Sierra de la Laguna, Baja California Sur, México (Maya *et al.*, 2002), se seleccionó para este estudio por las siguientes bondades biológicas: Es un organismo que vive en la superficie del suelo (epiedáfico) que contiene pigmentos como la scytonemina, aminoácidos tipo micosporinas y carotenoides que lo protegen contra la radiación (Bowker *et al.*, 2002; Büdel *et al.*, 1997), se ha observado en localidades que registran temperaturas de 60°C en el suelo (observación personal Maya Delgado), resistente a sequía, retiene la humedad en el suelo, sus filamentos en presencia de agua líquida se hinchan y absorben agua (Verrecchia *et al.*, 1995), por medio de heterocistos fija nitrógeno atmosférico en presencia de humedad, lo convierte en amonio que parte de él es liberado al ambiente y es susceptible de ser asimilado por las plantas que crecen alrededor (Evans y Johansen, 1999),

desarrolla un tejido gelatinoso que forma un sustrato adecuado para el establecimiento de otras cianobacterias (Fritz Sheridan, 1986) y las protege de la radiación UV (Bowker *et al.*, 2002), además de que tiene la capacidad de estabilizar el suelo y retener las partículas de suelo gracias a los exopolisacáridos que produce (Maya *et al.*, 2002; Verrecchia *et al.*, 1995), su condición fotosintética las hace ser productores primarios que fijan carbón y liberan oxígeno. Por estas características se ha considerado como un fertilizante orgánico alternativo en la agricultura de zonas áridas (López Cortés *et al.*, 2001; López Cortés y MayaDelgado, 2003).

La cianobacteria *Scytonema* posee características biológicas que la hacen ser un candidato potencial para varios usos biotecnológicos como se muestra en la Tabla I.

### **3.4 Producción de Biomasa**

Existen varios métodos de producción de biomasa para microalgas y cianobacterias, se pueden dividir en biorreactores a cielo abierto (al aire libre) y aquellos ubicados en instalaciones cerradas y controladas. La ventaja principal de los biorreactores a cielo abierto es su capacidad volumétrica pero su desventaja es la dificultad para controlar las condiciones ambientales como temperatura, luz, lluvia, etc. y la facilidad con la que se pueden contaminar los cultivos.



Tabla I. Uso biotecnológico potencial de *Scytonema* a partir de sus características biológicas.

Rasgos Biológicos	Función Ecológica	Potencial Biotecnológico	Citas
Fotosíntesis	-Fijación de CO <sub>2</sub> , incrementa el contenido de C en el suelo	-Productor primario. -Produce O <sub>2</sub>	López Cortés, 2003
Vainas y polisacáridos extracelulares	-Estabilización de la superficie del suelo -Retención de partículas y humedad en el suelo	-Restauración de suelos erosionados. -Mejoramiento de suelos -Atrapan iones de metales	López Cortés, 2003; Maya Delgado <i>et al.</i> , 2002; Belnap, 1993; Verrecchia <i>et al.</i> , 1995; De Philippis <i>et al.</i> , 2001.
Pigmento scytonemina	-Protección contra UV	-Industria de la cosmetología	Proteau <i>et al.</i> , 1993; García Pichel y Castehnoltz, 1991.
Heterocistos	-Fijación de N <sub>2</sub> -Contribución al ciclo de nitrógeno -Incorporación de N a la naturaleza en forma de amonio	-Biofertilizante	- López Cortés, 2003; López Cortés <i>et al.</i> , 2001, López Cortés y Maya Delgado, 2003
Rápido crecimiento	-Especie colonizadora	-Restauración de suelos erosionados. -Sistema modelo para estudios de procesos celulares y regulación de genes.	Fay, 1983; Fritz Sheridan, 1987.
Crecimiento filamentoso	-Formación de tramas que crean microhabitats y dan sombra a otros microorganismos.	-Aumenta la diversidad	Fritz Sheridan, 1987.

En biorreactores cerrados es más fácil controlar la esterilidad y pueden ser de tres tipos: 1) no agitados, sin aireación, se utilizan para hacer vino, cerveza y queso; 2) no agitados, con aireación; y 3) agitados con aireación (Cliffe, 2000). El tipo de reactor utilizado en este trabajo fue del tipo no agitado, con aireación. Este tipo de biorreactor se le inyecta la cantidad de aire necesario para que las burbujas ascendentes ejerzan una fuerza de arrastre sobre el fluido para que se mantenga en constante movimiento. Las ventajas principales de los biorreactores de elevación con aire comparados con los biorreactores de tanque agitado

son el corte escaso, requerimientos de energía relativamente bajos y construcción más simples (Cliffe, 2000). Hace unos años se desarrolló un nuevo biorreactor cerrado y tubular, fue desarrollado por Boussiba (1993) para solucionar algunos problemas de baja productividad causada principalmente por la penetración de la luz y la temperatura.

#### **3.4.1 Medidas de crecimiento microbiano**

Existen varias formas de medir el crecimiento microbiano, cada una de ellas tiene ventajas y desventajas. El método del peso seco es el más usado, consiste en secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante, la desventaja principal de éste método es que es lento. El método del volumen celular empaquetado se realiza mediante la centrifugación de la muestra y la decantación del medio líquido, éste método es rápido pero inexacto (Marison, 2000). El método de clorofila “a” es muy usado, pero tiene el inconveniente de que se puede presentar el fenómeno de adaptación cromática en el cual la cantidad y calidad de la luz puede modificar el contenido de pigmentos fotosintéticos dando resultados poco confiables.

### **3.5 Las Cianobacterias en la Retención de Humedad y Partículas de Suelo**

Las cianobacterias forman cortezas microbióticas que juegan un papel esencial en el régimen hídrico y la protección del suelo contra la erosión (Campbell *et al.*, 1989 en Verrecchia *et al.*, 1995). La capacidad de hinchamiento de los minerales del suelo combinada con el hinchamiento de los elementos biológicos, influyen fuertemente los procesos físicos del suelo como la tasa de infiltración, la generación de escorrentía, la

pérdida de agua por evaporación, etc., en otras palabras, las cianobacterias juegan un papel importante en la estructura y función de un ecosistema, especialmente en zonas áridas en donde el agua es escasa (Verrecchia *et al.*, 1995).

Las metodologías para medir la retención de humedad en el suelo, van de los aparatos más sofisticados como los sensores de absorción infrarrojo (Kleinsinger, 2002) hasta otros más sencillos como el tensiómetro que mide la tensión de equilibrio de la humedad del suelo, los bloques de yeso que miden los cambios de conductividad eléctrica y el método gravimétrico el cual consiste en obtener una muestra de suelo húmedo y secarla hasta peso constante, sacar la diferencia de pesos (peso húmedo menos seco/ peso seco) y obtener un porcentaje (Ortiz-Villanueva y Ortiz-Solorio, 1990). En el presente trabajo se utilizó éste último por ser sencillo, barato y ampliamente utilizado en agricultura.

Las cianobacterias, en particular las especies filamentosas, tienen la habilidad de estabilizar el suelo al formar agregados de partículas finas mediante los exopolisacáridos (Verrecchia *et al.*, 1995; Zulpa de Caire y Palma, 1999). Estos agregados se forman por varios mecanismos incluyendo: uniones físicas de las partículas de suelo por el enredamiento de filamentos, adhesión de vainas mucilaginosas o capas de mucílago excretadas por los tricomas de las cianobacterias, el pegado de partículas de suelo a lo largo de las paredes celulares de la cianobacterias (Verrecchia *et al.*, 1995). Estas uniones incrementan el contenido de materia orgánica en la corteza e incrementan la resistencia del suelo a la erosión hídrica y eólica al favorecer el desarrollo granular del suelo (Eldridge y Leys, 2003). También los desechos y otros productos viscosos microbianos favorecen el desarrollo granular del suelo y ejercen una influencia estabilizadora.

### 3.6 Fijación de Nitrógeno

El nitrógeno, junto con el carbono, hidrógeno y oxígeno, es un elemento esencial de los seres vivos ya que forma parte de los aminoácidos, de los ácidos nucleicos y los aminoazúcares y sus polímeros. Las reservas de N en el planeta son muy abundantes, el 79% de los gases de la atmósfera está compuesto por nitrógeno, también se encuentran grandes cantidades de este elemento en las rocas ígneas y sedimentarias. Sin embargo, el nitrógeno de las rocas se encuentra fijado en forma de amonio no intercambiable que limita su disponibilidad para la mayoría de los organismos (Guerrero, 2002).

La forma biológica más antigua de fijación de nitrógeno que se conoce, es la que llevan a cabo cianobacterias desde hace unos dos mil quinientos millones de años (Fay, 1983, 1992). La filogenia molecular basada en la secuenciación del gen 16S rRNA ha demostrado que la presencia de heterocistos en cianobacterias es una característica natural que agrupa coherentemente a las familias Nostocaceae, Rivulariaceae y Scytonemataceae y al orden Stigonematales (Castenholz *et al.*, 2001; Fay, 1983; García Pichel *et al.*, 2001; Maya *et al.*, 2002), las especies pertenecientes a estos grupos filéticos son parte de comunidades de microorganismos en el suelo que forman las llamadas cortezas microbióticas (Evans y Johansen, 1999).

El insumo, la pérdida y el reciclado de nutrientes son procesos fundamentales en cualquier ecosistema. El ciclo biogeoquímico del nitrógeno depende de las acciones bacterianas de fijación de N<sub>2</sub>, nitrificación y desnitrificación, así como también de la intervención humana a través de abonos nitrogenados sintetizados (Guerrero, 2002). La disponibilidad de N combinado, ya sea que haya sido fijado por microorganismos o por el hombre, es un factor limitante para la producción primaria en muchos ecosistemas especialmente en los

agrícolas (Anónimo 1; Delwiche, 1972; Guerrero, 2002; Vaishampayan *et al.*, 2001). De hecho, las plantas no podrían fotosintetizar si no dispusieran de formas fijadas de nitrógeno (Delwiche, 1972; Guerrero, 2002).

### **3.6.1 Fijación biótica de nitrógeno molecular**

Las cortezas microbióticas son contribuidores importantes en el ciclo de nitrógeno en muchos ecosistemas, especialmente en las zonas áridas y semiáridas, porque las cianobacterias y las bacterias que son de vida libre o simbioses en líquenes son capaces de fijar nitrógeno (Evans y Johansen, 1999). Klubek *et al.* (1978 en Evans y Johansen, 1999) observó que el 20% del nitrógeno asimilado por las cortezas se libera extracelularmente en forma de amonio. Por su parte Kershaw (1985 en Evans y Johansen, 1999) observó que en cortezas de *Nostoc* se libera el nitrógeno del 19 al 28% al medio circundante. Sin embargo, la tasa de insumo de nitrógeno está limitada por la disponibilidad de agua, la temperatura, y la pérdida de nitrógeno de la corteza mediante la filtración, la volatilización y la desnitrificación (Evans y Johansen, 1999).

La capacidad para la fijación de  $N_2$  está bien representada en la clase Cyanobacteriaceae, pero no todas las cianobacterias pueden fijar esta molécula; aquellas de vida libre que producen heterocistos y/o las que participan en la simbiosis de los líquenes son capaces de utilizarlo (Alexander, 1980; Belnap, 2001; Castenholz *et al.*, 2001; Maya *et al.*, 2002; Vaishampayan, 2001). Existen varios reportes de especies de cianobacterias de vida libre que no tienen heterocistos que son capaces de fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas como es el caso del género *Microcoleus* (Belnap *et al.*, 1993; Jeffries *et al.*, 1992), pero estudios recientes sugieren que esto puede ser debido a una relación simbiótica entre la

cianobacteria y bacterias heterótrofas fijadoras de nitrógeno alojadas en micrositios anaerobios de las vainas gelatinosas producidas por *Microcoleus* (Evans y Johansen, 1999; Jeffries *et al.*, 1992).

### **3.6.2 Heterocistos**

Los heterocistos (ver Anexo I. Heterocistos) son células especializadas de cianobacterias filamentosas que fijan nitrógeno molecular ( $N_2$ ) (Castenholz, 2001; Fay, 1983; Fogg *et al.*, 1973; Herrero *et al.*, 2001). No todas las cianobacterias filamentosas tienen la capacidad de desarrollar heterocistos, sólo aquellas que se encuentran dentro de dos grupos monofiléticos los cuales corresponden a los órdenes de Nostocales (algunas familias) y Stigonematales (Fay, 1983).

Los heterocistos (Figura 1b y 2) se forman a partir de células vegetativas cuando las formas combinadas de nitrógeno, como el amonio y el nitrato, están ausentes o en pequeñas cantidades en el ambiente (Fay, 1983) y cuando el balance de la relación C:N se encuentra en 8:1 (Fogg *et al.*, 1973). Se pueden desarrollar en el extremo del tricoma o estar intercaladas entre las células vegetativas. Se asume que un heterocisto es capaz de proveer de nitrógeno fijado en forma de aminoácidos (generalmente glutamina) a las células vegetativas que se encuentran entre un heterocisto y otro, y a su vez las células vegetativas adyacentes al heterocisto lo proveen de sustancias orgánicas requeridas como fuente de energía (ATP), agentes reductores y además devuelven el N recién fijado en compuestos orgánicos combinados (Fay, 1983; Thiel y Pratte, 2001).

Los heterocistos son fácilmente reconocibles bajo el microscopio óptico (Figura 2) ya que normalmente son más grandes que las células vegetativas, desarrollan gruesas capas

tegumentarias , tienen poros que los unen a las células vegetativas y presentan por lo general un color amarillo pálido (Fay, 1983).

En el proceso de fijación de nitrógeno, el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es reducido a amonio ( $NH_3$ ) en una reacción catalizada por la nitrogenasa, un complejo sistema enzimático (Fay, 1983, Syrett, 1981).



Figura 2. Heterocistos de *Scytonema ocellatum*, presentando coloración amarilla, mayor tamaño que las células vegetativas y los poros que los unen con las células adyacentes.

Esta reacción se lleva a cabo en ausencia de  $O_2$  ya que la nitrogenasa es extremadamente sensible al  $O_2$  libre, la exposición directa de la enzima al aire resulta en la inactivación e incluso en la destrucción de componentes protéicos, por esto el Fotosistema II esta inactivo mientras que las unidades del Fotosistema I que provee energía en forma de ATP incrementan (Herrero *et al.*, 2001; Staal *et al.*, 2002).

La nitrogenasa utilizada por los organismos fijadores de  $N_2$ , puede lograr, a temperaturas y presiones normales, lo que requiere cientos de grados y una presión de cientos de

kilogramos en un reactor de amoníaco sintético. La cantidad total de nitrogenasa en el mundo probablemente no pasa de unos cuantos kilos (Delwiche, 1972).

Los principales factores que controlan la actividad de fijación de nitrógeno en cianobacterias fotosintéticas son la temperatura, la disponibilidad de agua (Campbell, 1987), fuentes alternas de compuestos nitrogenados que requieren menos energía para asimilar y la relación C:N en las células (Fogg *et al.*, 1973).

### **3.7 Cianobacterias como Biofertilizantes**

La agricultura depende principalmente de cuatro tecnologías: (1) Mecanización, (2) irrigación, (3) fertilización y (4) control químico de las malas hierbas e insectos (Brown, 1972). Las cianobacterias incrementan la fertilidad del suelo de diferentes maneras. Algunas fijan N<sub>2</sub> e incrementan el contenido de compuestos nitrogenados en el suelo, otras durante su desarrollo liberan al ambiente productos extracelulares, por lo general polisacáridos y péptidos, posteriormente enriquecen el suelo con materia orgánica cuando mueren y se descomponen. Los exopolisacáridos mantienen las actividades bacterianas y fúngicas que mejoran la estructura del suelo y promueven la mineralización de la materia orgánica, en este proceso se liberan nutrientes que requieren las plantas (Caire *et al.*, in press en Zaccaro, 2000; Fay, 1983).

Las cianobacterias diazotróficas (fijadoras de nitrógeno) utilizan la luz solar como fuente de energía para generar ATP y el potencial de reducción (NADPH), con esto fijan carbono y nitrógeno atmosférico, estas dos características las hace tener un gran potencial como biofertilizantes. Por otra parte, se sabe que algunas cianobacterias también solubilizan el



fosfato del suelo. El fósforo es el segundo nutriente importante después del nitrógeno para las plantas y los microorganismos (Hedge *et al.*, 1999 en Zaccaro, 2000). El potencial agronómico de los heterocistos de las cianobacterias, ya sea de vida libre o simbioses, ha sido bien reconocida en todo el mundo (Zaccaro, 2000).

Las cianobacterias han sido muy utilizadas en campos inundados de arroz (Kalininskaya *et al.*, 1989; Storni *et al.*, s/A; Vaishampayan *et al.*, 2001) de muchas partes del mundo en los cuales ha sido el recurso natural más fácilmente disponible y barato que ha servido como biofertilizante. También se han aplicado en cultivos de chile y tomate obteniendo altas tasas de germinación de semillas de tomate y un incremento en la talla y peso de chiles (López Cortés *et al.*, 2001; López Cortés y Maya Delgado, 2003). El uso de la biotecnología de cianobacterias diazotróficas en la agricultura del arroz ofrece una alternativa inmediata de fertilización así como la reducción de la demanda de combustible fósil para la producción de fertilizantes orgánicos (Kalininskaya *et al.*, 1989; Zaccaro, 2000).

Se asume que los biofertilizantes tienen un gran papel como complemento o suplemento de fertilizantes químicos en cultivos de cereales debido a que estos sistemas de producción tienen una alta tasa de renovación de nutrientes, y por el exorbitante costo de fertilizantes (Zaccaro, 2000).

En 1989, Singh y Singh (en Vaishampayan *et al.*, 2001), realizaron un estudio de costos sobre fertilizantes químicos y biofertilizantes con cianobacterias en la India. Ellos concluyeron que 35 kg N ha<sup>-1</sup> cuesta alrededor de 2 dólares. La biomasa requerida de cianobacterias para inocular un campo de arroz (10 kg ha<sup>-1</sup>) para proveer la misma cantidad de N costó menos que 1 dólar. Se propuso que si la tecnología cianobacteriana fuera introducida en el 50% de los campos de cultivo de arroz de la India, resultaría en salvar 3.8

$\times 10^5$  ton N con un costo aproximado de 30,400 dólares, y si los biofertilizantes fueran producidos por los mismos agricultores, los costos serían despreciables. Acorde con estos resultados, su recomendación fue complementar la fertilización de N inorgánico con la aplicación de cianobacterias. El costo beneficio que se calculó fue de 1:10, sin embargo, esto es aplicable sólo a la India, por lo que cada país debe hacer sus propias estimaciones (Vaishampayan *et al.*, 2001).

Los biofertilizantes mantienen los niveles adecuados de materia orgánica en el suelo que es esencial para la sostenible y alta producción de cultivos. Los cultivos alteran la estructura y estabilidad del suelo y reduce la cantidad de N y materia orgánica en el suelo. La naturaleza de esta materia orgánica no es muy conocida, pero la mayor porción podría ser biomasa microbiana (Singh y Singh, 1995 en Zaccaro, 2000).

Una de las debilidades de esta biotecnología es que la severa aplicación de agroquímicos, especialmente herbicidas, se ha reportado que en muchos casos inhiben el crecimiento de las cianobacterias diazotróficas, pudiendo causar incluso algunas mutaciones. Por eso, una biotecnología exitosa requiere de la selección cuidadosa de cepas de cianobacterias diazotróficas que toleren las concentraciones de herbicidas de los campos agrícolas (Tiwari *et al.*, 1991 en Zaccaro, 2000).

Un suelo productivo se caracteriza no necesariamente por la mera presencia de grandes cantidades de nutrientes para las plantas sino por la rapidez con la que estos nutrientes son liberados en forma aprovechable. El conocimiento de algunos de los procesos microbianos fundamentales es de primera importancia para la aplicación correcta de ciertos principios relativos a las prácticas del buen manejo del suelo. Un suelo productivo es aquel en el que

las condiciones químicas, físicas y biológicas son favorables para la producción económica de cultivos adaptados a un área particular (Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990).

### **3.7.1 Aplicación de inóculos**

Los ambientes en donde se han realizado la mayoría de los estudios sobre aplicación de inóculos de cianobacterias han sido en cultivos inundados de arroz como biofertilizantes (Vaishampayan *et al.*, 2001) y en zonas áridas como restauradores de suelos (Belnap, 1993; Kubeckova *et al.*, in press; Riley *et al.*, 2001), también hay estudios en lechos volcánicos como colonizadores (Fritz Sheridan, 1987) y en zonas semiáridas como biofertilizante (López Cotés *et al.*, 2001b, 2003).

La aplicación de inóculos de cianobacterias al campo requiere procesamiento: cosechar y secar, ya sea en hojuelas secas (Vaishampayan *et al.*, 2001) o pellets (Buttars *et al.*, 1998), lo cual reduce la viabilidad celular e incrementa el costo de producción por lo que la aplicación directa de cianobacterias al campo debe ser considerada (Vaishampayan *et al.*, 2001; Watanabe 1984 en Boussiba, 1993). En los experimentos realizados por López Cortés *et al.* (2001b, 2003), se aplicó la biomasa de la cianobacteria *Scytonema ocellatum* directamente del biorreactor al suelo contenido en bolsas de 50 kg con planta de chile, en su trabajo no se reporta la sobrevivencia ni mortalidad del inóculo pero se reporta un aumento en el peso y longitud de los frutos de chile.

## **3.8 Valoración Agrícola de *Scytonema* en Chile**

Existen experiencias previas en la producción de biomasa de *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 utilizando medio líquido Z8<sup>0</sup>, temperatura de 28°C, intensidad de luz de 50

$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 12/12 horas luz/oscuridad (López Cortés *et al.*, 2001b). La biomasa cosechada de dichas experiencias de escalamiento de la producción de cianobacterias se aplicó en cultivos para evaluar la germinación de semillas de tomate así como el crecimiento vegetativo y la producción de fruto en Chile California en el estado de Baja California Sur, México. Los resultados que se obtuvieron en dicha experiencia revelaron que la aplicación de cianobacterias en los diferentes cultivos tiene efectos positivos en la germinación de semillas y en la talla y peso en gramos de la producción de frutos, por lo que se considera que esta cianobacteria es un buen candidato para usarse como fertilizante biológico en suelos áridos y pobres en nitrógeno, además de que biotecnológicamente, el crecimiento de *Scytonema ocellatum* en fotorreactores con aireación es relativamente rápido, fácil y barato (López Cortés *et al.*, 2001b).

### **3.9 *Capsicum annuum* L.**

El chile tiene una larga tradición cultural en México (ver Anexo II. *Capsicum annuum* subtítulo “Leyenda del Chile en Tula”), forma parte de la dieta del mexicano en todos los niveles sociales (Ramírez, 2002) y es uno de los atributos que identifican al mexicano en todo el mundo. El gusto por el chile se ha extendido a varios países Europeos, Asiáticos y Africanos convirtiéndose así en un cultivo de uso mundial, e incluso, ha llegado a ser un condimento indispensable de platillos nacionales de países como India, Hungría y otros (Long Solís, 1998).

El cultivo de chile tiene la ventaja de ser fácilmente adaptable a diversas condiciones de clima, suelos y altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm (Long Solís, 1998; Ramírez, 2002).

El chile poblano al deshidratarse se convierte en chile ancho o mulato, dependiendo de si madura en tonos de rojo oscuro o achocolatado casi negro. El poblano de óptima calidad es grande, de más de 10 cm de largo y 6 de ancho. Es medianamente picante, de aroma fuerte y agradable. Hay tres tipos de poblano fresco: verde, negruzco y en forma de corazón. El chile poblano verde, que al madurar se le da el nombre de chile ancho, se cultiva mayormente en el país (Long Solís, 1998).

La planta de chile es susceptible al frío y requiere de un clima templado, sin embargo, las temperaturas altas la perjudican causando la caída de las flores y por lo tanto, la mala formación del fruto. En condiciones óptimas, debe haber por lo menos de 3 a 5 meses de calor para su buen desarrollo. El suelo franco arenoso y bien drenado ayuda a evitar enfermedades de las raíces causadas por el exceso de agua, pues requiere de humedad controlada a lo largo de su ciclo de cultivo (Long Solís, 1998).

Si el cultivo se encuentra bajo riego rodado es recomendable aplicar un fertilizante nitrogenado y fósforo en el suelo al momento de la preparación del surco, después del trasplante es recomendable aplicar 100 kg de nitrato de amonio y volver a aplicar 100 kg de nitrato de amonio después de la floración en amarre de fruto, es necesario también monitorear bien la humedad del terreno y el número de riegos que se le suministren al cultivo ya que esta variedad tiene raíces grandes y vigorosas, un tallo leñoso por lo que la humedad debe ser constante para lograr un mejor desarrollo, se recomienda regar una vez por semana o cada 10 días, se deben hacer aplicaciones periódicas de Ca, Mg y B para darle

consistencia, buen amarre y color al fruto. Es recomendable también aplicar microelementos de manera periódica como Fe, Zn y B, ya que la planta es vigorosa y es muy importante el uso de estos elementos hasta antes de la floración, con el fin de lograr el máximo de fructificación. El pH del suelo y agua debe de ser alrededor de 6.0 a 6.5 para lograr un mejor desarrollo de la variedad y lograr una mejor absorción y disponibilidad de nutrientes en la planta (Sakata Seed de México, 2002).

### ***3.9.1 Aplicaciones del chile***

El chile tiene varias aplicaciones en diversas ramas de la industria, se le extraen oleorresinas o extractos solubles que son utilizadas para dar sabor a los alimentos (carnes frías, salsas, etc.) y como colorante natural en alimentos y cosméticos, en la industria avícola se mezcla con el alimento para producir la yema más rojiza, en la industria farmacéutica se utiliza como estimulante y anestésico además de que se conoce su gran valor vitamínico, en la industria tabacalera, en la fabricación de pintura marina y en la elaboración del gas pimienta. (Long Solís, 1998; Ramírez, 2002).

## 4. HIPOTESIS

### 4.1 Hipótesis de la optimización de la producción de biomasa

4.1.1 Si algunos de los factores que limitan la velocidad de crecimiento de organismos fotótrofos aerobios son la disponibilidad de nutrientes y la aireación, entonces se espera que a mayor disponibilidad de nutrientes (recambio del medio de cultivo) y un flujo de aireación constante, se incremente la velocidad de crecimiento en cultivos de *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22.

4.1.2 Si *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 habita en ambientes semiáridos y expuestos al sol, entonces se espera que a temperatura de 25°C e intensidades de luz  $> 100$  y  $< 500 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  resulten en los valores máximos de velocidad de crecimiento poblacional (K).

### 4.2. Hipótesis de retención de humedad

*Scytonema* tiene hábitos de crecimiento filamentosos que resulta en una red con capacidad de ocupar los poros del suelo que existen entre las partículas minerales, además de poseer vainas gruesas polisacáridas que atrapan la humedad, por lo tanto, se espera que la aplicación de *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 en la superficie del suelo muestre los valores mayores de porcentaje de humedad retenida en el suelo.

### 4.3. Hipótesis de valoración agrícola

Si la cianobacteria *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 posee la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y liberar nitrógeno amoniacal al suelo, esperaríamos que el

enriquecimiento de nitrógeno en el suelo sea aprovechado por plantas de chile ancho que resulten con los valores máximos de talla, peso y contenido de proteínas totales en los frutos.

Las siguientes puntos se refieren a tratamientos que ayudan a valorar el efecto de la *Scytonema* en las plantas de chile. Las hipótesis estadísticas de estos tratamientos son:

Hipótesis nula (H<sub>0</sub>): No hay diferencias significativas en el peso, talla y contenido de proteínas totales entre tratamiento.

Hipótesis alternativa (H<sub>a</sub>): Sí hay diferencias significativas en el peso, talla y contenido de proteínas totales entre tratamiento.

- 1) Tratamiento con 100% sustrato orgánico vs tratamiento con 30% sustrato orgánico + 70% suelo natural.
- 2) Tratamiento con fertilizante Hoagland al 50% vs agua.
- 3) Diferentes cantidades de biomasa de *S. ocellatum* aplicada al sustrato donde se encuentran las plantas de chile.

#### **4.4 Hipótesis de sobrevivencia de *S. ocellatum* en suelo**

Se reconoce a *Scytonema ocellatum* ser una cianobacteria dormante en suelos de regiones semiáridas que bajo condiciones de presencia de humedad y luz reactivan su aparato fotosintético, por lo que esperamos que mantenga su sobrevivencia durante un ciclo de producción agrícola que emplea sistema de riego.



## 5. OBJETIVO GENERAL

Optimizar la producción de biomasa de la cianobacteria *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22, evaluar su capacidad como biofertilizante en chile ancho (*Capsicum annuum* L.) y su contribución en la retención de humedad en el suelo.

### Objetivos particulares

1. Determinar los porcentajes óptimos de recambio del medio de cultivo para el crecimiento de la cianobacteria *S. ocellatum*.
2. Determinar la tasa de crecimiento constante de *S. ocellatum* en diferentes condiciones de intensidad de luz y temperatura.
3. Determinar el efecto de *S. ocellatum* en la retención de humedad en el suelo.
4. Evaluar el contenido de amonio en suelos con y sin *S. ocellatum*.
5. Evaluar el efecto de *S. ocellatum* como biofertilizante a través de la producción de chile ancho y el contenido de proteína en los frutos de chile.
6. Evaluar la integridad y viabilidad de *S. ocellatum* en el suelo.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Optimización de la Producción de Biomasa de *Scytonema ocellatum*

#### 6.1.1 Inóculo

La *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 que se utilizó en la presente investigación se obtuvo de la colección de cianobacterias del CIBNOR ([www.cibnor.mx/malgas/ealgas.html](http://www.cibnor.mx/malgas/ealgas.html)). Esta cepa se aisló de cortezas microbióticas de suelos erosionados de selva baja caducifolia de Sierra de la Laguna, Baja California Sur, México (Maya *et al.*, 2002). En adelante, se referirá a esta cepa como *S. ocellatum*.

La selección del pre-inóculo de los experimentos se realizó a partir de algunos cultivos pre-existentes de *S. ocellatum* mantenidos en matraces con medio líquido Z8<sup>0</sup> (modificado de Carmichael, 1986) puestos en un agitador orbital. Se eligieron los cultivos en los cuales se formaron colonias esféricas, éstos cultivos tenían un color verde intenso y mayor biomasa que el resto. Un análisis más fino al microscopio nos sugirió que éstos cultivos eran los mejores para el experimento debido a la integridad de sus filamentos y a la mayor capacidad de multiplicación celular.

#### 6.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado es una modificación del Z8 de Carmichael (1986), al que se ha llamado Z8<sup>0</sup> (López Cortés y Maya Delgado, 2003) el cual no contiene fuentes principales de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$  y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y contiene  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  como una fuente de calcio (Anexo III). De esta manera el medio de cultivo se vuelve selectivo y sólo permite el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, fomenta la producción de

heterocistos y reduce los riesgos de contaminación cuando se escala a grandes volúmenes (López Cortés *et al.*, 2001). El medio de cultivo empleado en biorreactores con capacidad menor a 3 L se realizó con agua destilada estéril Monarca; para los biorreactores de 19 L se utilizó agua destilada Monarca no estéril. En el caso especial de este proyecto se usó Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a diferencia de la formulación original de Carmichael (1986) debido a una omisión del autor.

### ***6.1.3 Medidas de crecimiento***

#### *Toma de muestras y cosecha de biomasa*

Debido a que la *S. ocellatum* forma colonias esféricas de diferentes diámetros y pesos, la toma de muestras no es muy uniforme y por lo tanto poco precisa. Para tomar muestras en matraces de 500 mL, se cortaron las puntas de pipetas Pyrex de 10 mL IN 2/10 No. cat. 401374 para permitir la entrada de las colonias. Se agitó 10 veces cada matraz hasta observar una distribución uniforme de las colonias en el medio, se contaron 5 segundos y se pipetearon 10 mL de cultivo. Se decidió que esa muestra era representativa del cultivo siempre y cuando hubiera una distribución uniforme de colonias dentro de la columna de la pipeta. Una vez teniendo esta condición se vació rápidamente 1 mL de la muestra en un tubo Eppendorf y se repitió el procedimiento, de tal manera que de cada matraz se obtuvieron 2 mL de cultivo. Es importante enfatizar que el vaciado de 1 mL de la pipeta se tuvo que hacer rápidamente debido a que las colonias no permanecen en suspensión. Se decidió que el tamaño de muestra sería 1 mL ya que se perdía mucha biomasa si se extraían muestras mayores.

Debido a la dificultad de obtener muestras representativas del cultivo (ya que se podían extraer al azar la mitad de las colonias grandes o ninguna, disminuyendo en gran medida el contenido de *Scytonema* en el matraz generando una variación muy alta en las mediciones de crecimiento de biomasa) al resto de los experimentos se les midió la biomasa inicial y la final para obtener la velocidad de crecimiento poblacional (K).

Para la toma de muestras y cosecha de biomasa de los garrafones se probaron varios métodos de extracción, procurando mantener el cultivo homogéneo, cerrado y estéril. El método que mejor funcionó fue una modificación del que se utiliza en el Laboratorio de Fitotecnia Marina del CIBNOR. Los garrafones de plástico de 19 L se tapan con un tapón de goma al cual se le hacen 3 perforaciones en donde se colocan 3 tubos: un tubo corto de respiración que no entre en contacto con el medio y tenga un tapón de algodón; un tubo largo y delgado que es el tubo de aireación; es importante que éste sea delgado para que las burbujas de aire sean pequeñas y aumente el área superficial disponible para la transferencia de oxígeno. Este tubo deberá estar a 7 cm arriba del fondo del garrafón. El tercer tubo es el de extracción, que para el caso de *Scytonema* debe tener un diámetro interno de 2/8 de pulgada. Este tubo deberá permanecer 4 cm por encima del fondo del garrafón. Es muy importante esta diferencia de alturas de los tubos de aireación y extracción porque si el tubo de extracción está a la misma altura o por arriba del tubo de aireación, se corre el riesgo de que las burbujas de aire se escapen por el tubo de extracción y el cultivo presente una deficiencia de oxígeno. La extracción se realizó de la siguiente manera: una vez que el cultivo estuvo homogenizado, se tapó el tubo de aireación y se inyectó aire por el tubo de respiración, por diferencia de presión, el cultivo salió por el tubo de extracción que estuvo previamente conectado a una manguera.

Existen varias formas de medir el crecimiento microbiano, cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas, en el presente trabajo se decidió trabajar con 4 de ellas y correlacionarlas para fortalecer sus ventajas:

#### *Peso seco*

Dependiendo del volumen de la muestra, la biomasa se colocó en tubos Eppendorf de 1 mL, extendida en malla-sec de Procter and Gamble, S.A.® ó en un colador de plástico de 1 mm de luz. El peso seco se determinó secando las muestras en horno a 40°C durante 24 horas con sílica gel, se sacaron del horno y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. La biomasa seca se pesó en una balanza analítica Mettler Toledo AG 204 sobre una membrana de papel cera que no absorbe humedad.

#### *Clorofila “a”*

Las determinaciones de clorofila “a” se realizaron con la misma biomasa del peso seco, esto con el fin de poder hacer una correlación. Las muestras secas se pusieron en un mortero con pistilo (Glass Potter) con 1 mL de metanol al 90%, se molieron en ausencia de luz y se pusieron en hielo, se centrifugaron a 10,000 G a 10 °C durante 10 minutos en una microcentrífuga HERME Z233 MK-2. Los sobrenadantes se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU 640 a una longitud de onda de 665 nm y se utilizó la fórmula de Talling y Driver (citado en Tandeau de Marsac y Houmard, 1988) para calcular µg/mL de clorofila “a” a partir de la absorbancia.

$$C (\mu\text{g/mL}) = \text{D.O.}_{665\text{nm}} \times 13.9 \quad (2)$$

### *Volumen celular empaquetado*

Se midió la biomasa celular en volumen siguiendo el siguiente procedimiento: El total del cultivo o de la muestra se pasó por un tamiz de 200  $\mu\text{m}$  de luz para obtener la biomasa. La biomasa obtenida, se colocó en tubos Falcon de 15 ó 50 mL dependiendo de la cantidad, se les extrajo el medio de cultivo manualmente con pipetas Pasteur de 9.5 pulgadas y se midió el volumen de la biomasa drenada. Este procedimiento se hizo para medir el tamaño de los inóculos y la biomasa final de los diferentes experimentos. Para obtener una correlación entre los valores de volumen celular empaquetado y peso seco, se obtuvieron diferentes tamaños de muestras medidas en volumen, se secaron a 37 °C durante 48 horas y se pesaron los botones.

### *Diámetro de las colonias*

En el experimento de los matraces en agitación, se midieron las colonias presentes en 1 mL. Las colonias se colocaron en una caja petri, se separaron con agujas de disección, se les extrajo el exceso de agua con una pipeta Pasteur y se midió el diámetro de cada una en un microscopio estereoscópico Southern Precision. Para hacer una correlación entre el diámetro de las colonias y el peso seco, se secaron algunas colonias de diferentes tamaños en un horno a 37 °C durante 48 horas.

Para medir la velocidad de crecimiento poblacional, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$K = 1/tg \quad (3)$$

$$tg = t/n \quad (4)$$

$$n = \frac{\log_{10}N_t - \log_{10}N_0}{0.301} \quad (5)$$

En donde K es la velocidad de crecimiento constante de la población, tg es el tiempo de generación, t es el tiempo en días y n es el número de generaciones que ocurre en la fase exponencial.

#### **6.1.4 Recambio del medio de cultivo (Cultivo en sistema de agitación)**

El cultivo en agitador orbital de *S. ocellatum* se realizó en matraces de 500 mL con 300 mL de medio líquido de cultivo Z8<sup>0</sup> (modificado de Carmichael, 1986). Se inocularon con 1 mL de biomasa celular empaquetada, se mantuvieron bajo condiciones de fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, intensidad de luz de 100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura a 25±1 °C y agitación constante a 200 rpm.

Bajo estas condiciones, se realizaron por triplicado 3 tratamientos de porcentajes de recambio de medio de cultivo Z8<sup>0</sup> que son 0%, 35% y 70%. Los recambios se realizaron cada 8 días durante 32 días. Antes de cada recambio, se tomaron alícuotas de 2 mL de cultivo para medir el crecimiento en términos de clorofila a, peso seco, volumen celular empaquetado y tamaño de las colonias.

#### **6.1.5 Incubación con diferentes concentraciones de fuente de nitrógeno**

En sistema de aireación se cultivó *S. ocellatum* en medios de cultivo Z8 con diferentes concentraciones de fuente de nitrógeno: el Z8 con NaNO<sub>3</sub> y Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, el Z8<sup>1/2</sup> con la mitad de la concentración de estos dos compuestos y el Z8<sup>0</sup> que no contiene fuente de NO<sub>3</sub>.

### **6.1.6 Cultivo en sistema de aireación**

Se realizaron cultivos bajo 5 diferentes condiciones ambientales en sistemas de aireación: (1) fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad, intensidad luminosa de  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $25 \pm 1$  °C y aireación con bomba de acuario Máxima R (flujo 5 L/min); (2) fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad, intensidad luminosa de  $90 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $20 \pm 1$  °C y aireación con Blower; (3) 24 horas luz,  $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $26 \pm 1$  °C y aireación con bomba de acuario Máxima R (flujo 5 L/min); (4) 24 horas luz, intensidad luminosa de  $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $23 \pm 1$  °C y aireación con Blower; (5) 24 horas luz,  $500 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $23 \pm 1$  °C y aireación con Blower.

### **6.1.7 Escalamiento**

Se realizó el escalamiento del cultivo de *Scytonema ocellatum* a partir de matraces de 250 mL hasta llegar a garrafones de plástico de 19 L. Los pasos que se siguieron se muestran en la Figura 3. Para pasar de un nivel a otro, el cultivo se lavó en medio Z8<sup>0</sup>, se vació el contenido del biorreactor en un tamiz estéril de 200  $\mu\text{m}$  de luz, y se le vertió medio litro de Z8<sup>0</sup>, una vez limpio el cultivo se midió el volumen celular empaquetado y se colocó en el siguiente nivel.

### **6.1.8 Cinética de crecimiento en garrafones de 19 L**

Se realizó un experimento para determinar la cinética de crecimiento de *S. ocellatum* en 5 garrafones de 19 L con medio Z8<sup>0</sup> bajo condiciones de aireación, 24 horas luz, intensidad luminosa de  $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  y temperatura de  $26 \pm 1$  °C. Cada tercer día se tomaron 2 alícuotas de 1 L de cultivo durante 48 días, se les determinó volumen celular empaquetado y peso seco.



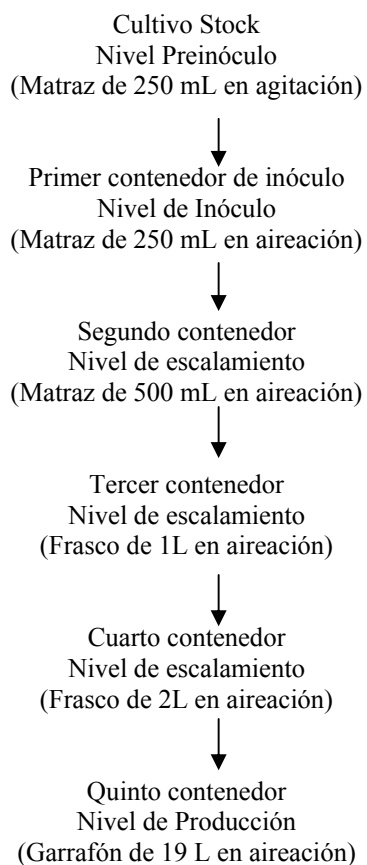


Figura 3. Pasos y niveles del escalamiento de la producción de biomasa de *Scytonema ocellatum*.

## 6.2 Retención de Humedad

### 6.2.1 Retención de humedad en macetas

El experimento de retención de humedad se realizó en el mes de diciembre del 2002. Se observó variación en las condiciones climáticas del 2 al 11 de diciembre; a las 6:00 hrs se registraron temperaturas entre 14 y 23 °C con humedad relativa entre 80 y 92 % y a las 13:00 hrs entre 26 y 28 °C con humedad relativa de 68 a 87 %. Del 12 al 18 de diciembre

las temperaturas a las 6:00 hrs fueron entre 8 y 12 °C con humedad relativa entre 76 y 88%, y a las 13:00 hrs entre 28 y 32 °C con humedad relativa entre 54 y 65 %. Se utilizaron 12 macetas de 16 cm de ancho, 56 cm de largo y 13 cm de alto. En el fondo se pusieron 2 kg de grava y se rellenaron con 10 kg de suelo franco arenoso del campo agrícola experimental del CIBNOR. A las macetas se les administraron por triplicado 3 diferentes concentraciones de volumen celular empaquetado de cianobacterias: 0 mL, 8 mL (862.72 mg peso seco), 16 mL (1730.72 mg peso seco) y 25 mL (2707.22 mg peso seco). Se llevaron a la capacidad de campo y a partir de ese momento se tomaron muestras cada tercer día. El porcentaje de humedad se obtuvo siguiendo el método gravimétrico en el cual la muestra se pesa en húmedo, después se seca a 80 °C durante 72 horas, se pesa en seco y se aplica la siguiente fórmula (OrtizVillanueva y Ortiz Solorio 1990):

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso suelo húmedo} - \text{Peso suelo seco}}{\text{Peso suelo seco}} \times 100 \quad (6)$$

### **6.2.2 Retención de humedad en el campo**

Se prepararon 16 cuadros de 50 x 50 cm formando una cuadrícula en el Campo Agrícola Experimental del CIBNOR. Las camas se llevaron a capacidad de campo, primero regando a saturación, agregándoles 20 L de agua en la mañana y 10 L más de agua por la tarde. La cuadrícula se dividió en 4 hileras con cuatro camas cada una, una cama de cada hilera se cubrió con mantillo de frijol gandul (*Cajanus cajan*). El 90 % de la superficie de un cuadro de cada hilera fue cubierta con biomasa de *Scytonema ocellatum* (120 mL de volumen celular empaquetado ó 13014.72 mg de peso seco) mientras que en otro cuadro se cubrió el

30 % de su superficie con biomasa de esta cianobacteria (40 mL de volumen celular empaquetado ó 4334.72 mg de peso seco). Al cuadro restante de cada hilera no se le aplicó ningún tipo de cobertura y se tomó como el control. En la figura 4 se muestra la distribución de los tratamientos y sus réplicas de las camas en el campo.

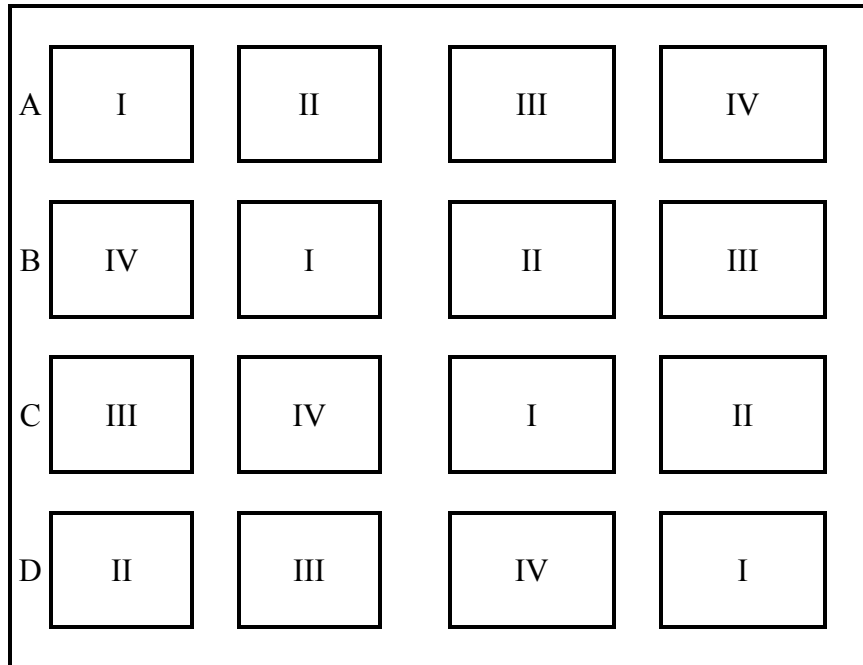


Figura 4. Disposición de los tratamientos de retención de humedad en el campo. I) Control (sin cobertura); II) Tratamiento de cobertura orgánica (300 g de frijol gandul); III) Tratamiento con cobertura total de *Scytonema ocellatum* (13 g peso seco); IV) Tratamiento con cobertura parcial de *Scytonema ocellatum* (4.3 g peso seco). A, B, C y D son las hileras de las réplicas.

Cada día se realizó un muestreo con 3 repeticiones por cada cama a 2 profundidades (0-15 y de 15-30 cm), se calculó la retención de humedad siguiendo el método gravimétrico (ec. 6).

Las condiciones climáticas del 17 al 24 de junio del 2003 fueron: a las 8:00 hrs. temperaturas entre 12 y 19 °C y humedad relativa entre 86 y 90 %, a las 15:00 hrs. las temperaturas oscilaron entre 37 y 40 °C y la humedad relativa entre 50 y 54 %; del 25 al 30 de junio fueron: a las 8:00 hrs. temperaturas entre 19 y 24 °C y humedad relativa entre 78 y 83%, a las 15:00 hrs. las temperaturas oscilaron entre 36 y 38 °C y la humedad relativa entre 58 y 64%.

### **6.2.3 Parámetros visuales**

A partir del día cero se le dio seguimiento visual a cada cuadro en cuanto a la coloración, textura y humedad de la capa superficial del suelo y de las láminas de *Scytonema*.

## **6.3 Valoración Agrícola de *S. ocellatum* en Cultivo de Chile**

### **6.3.1 Cultivo de chiles**

Para el presente proyecto se eligió el chile ancho por tener un alto valor comercial a nivel nacional (ACERCA, 2003) y ser uno de los cultivos hortícolas más importantes del estado de Baja California Sur (García Hernández, 2001). Se utilizaron plántulas de la variedad “Caballero” (Sakata Seed ®), un híbrido que genera frutos grandes, de 12 a 16 cm de longitud y es de 2 a 4 semanas más precoz que las variedades de polinización abierta. Requiere de la fertilización del suelo cuando se elaboran los surcos, después del transplante de semillero a campo y después de la floración para que “amarre” el fruto (Sakata, 2002). El experimento se desarrolló en una casa sombra. El 2 de enero del 2003 se colocaron las plántulas en macetas de 5 kilos de capacidad con sustrato previamente hidratado.

Se utilizó un diseño trifactorial, por bloques al azar, con tres repeticiones, considerando para el factor A el tipo de sustrato: A1) 100 % de mezcla comercial de materia orgánica Sunshine 3® y A2) mezcla de 30 % Sunshine 3® mas 70 % de suelo franco arenoso. Como factor B se consideró el tipo de riego: B1) fertilizante Hoagland al 50% (Anexo IV) y B2) agua. Las plántulas con 100 % sustrato orgánico se regaron cada día con 300 mL de fertilizante o agua, según el tratamiento, mientras que las plántulas con el sustrato mixto se regaron los primeros 28 días con 300 mL, hasta que las plantas empezaron a mostrar síntomas de estrés hídrico debido a que esta mezcla retiene el agua, se suspendió el riego una semana y se reanudó con 100 mL cada día. El factor C fue la cantidad (mg/mL tomando como base 300 mL) y frecuencia de aplicación de *Scytonema ocellatum* en el sustrato: C1) 0 mg/mL (control); C2) 2 aplicaciones de 0.14 mg/mL, la primera en etapa de floración y la segunda en fructificación; C3) 1 aplicación de 0.22 mg/mL en etapa de floración; C4) tres aplicaciones de 0.24 mg/mL la primera en etapa de plántula, la segunda en floración y la tercera en fructificación; C5) 1 aplicación de 1.14 mg/mL en etapa de plántula; C6) 1 aplicación de 5.4 mg/mL en etapa de floración y solamente para el tratamiento de sustrato mixto regado con agua se aplicó 2 veces 5.4 mg/mL, la primera en etapa de floración y la segunda en fructificación.

### ***6.3.2 Mediciones de la planta de chile***

#### *Clorofila a y b*

La clorofila se midió por triplicado en la tercera hoja de la fronda de la planta (contando desde el ápice hacia abajo) mediante dos métodos: utilizando el SPAD-501 Chlorophyll Meter el cual mide indirectamente la cantidad de clorofila mediante fluorescencia (Azia y

Steward, 2001) y el método por espectrofotometría en el cual se recortaron 3 discos de ½ pulgada de diámetro de la hoja, se colocaron en solvente (acetona al 80%) y se dejaron 72 horas en la oscuridad. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro Beckman DU 640 a 645 y 665 nm, los valores que resultaron se multiplicaron de la siguiente manera:

$$\text{Clorofila a} = (M1 \times 12.78) - (M2 \times 2.6) \quad (7)$$

$$\text{Clorofila b} = (M1 \times 22.86) - (M2 \times 4.7) \quad (8)$$

$$\text{Clorofila total} = (\text{Clorofila a} + \text{Clorofila b}) \quad (9)$$

En donde: M1 = Abs a 645 nm y M2= Abs a 665 nm

El resultado está dado en mg/mL de clorofila. Las secciones de las hojas utilizadas para la extracción de clorofila se cortaron inmediatamente después de cada lectura con el SPAD.

#### *Mediciones a los frutos del chile*

Se midió con un vernier la longitud del fruto fresco. El peso fresco se obtuvo mediante una balanza Acculab VI-200, los frutos se secaron durante 3 días a 108 °C y se pesaron en la misma balanza. Mediante el método de Kjeldhal se obtuvo el nitrógeno total y se multiplicó por el factor 6.25 para calcular el contenido de proteína .

### **6.4 Determinaciones Químicas y Físicas del Suelo**

#### **6.4.1 Amonio**

El contenido de amonio en el suelo se realizó mediante la técnica modificada para microplaca de Solórzano (1969) (Hernández López y Vargas Albores, en prensa):

1. Se colocaron 10 µL de solución de fenol (Reactivo 1) en cada cavidad de una microplaca

2. Se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de muestra
3. Se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de nitroprusiato (Reactivo 2)
4. Se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de mezcla oxidante (Reactivo 3)
5. Se tapó con aluminio y se incubó 1 hora
6. Se leyó a una absorbancia de 640 nm

Reactivo 1: Se disolvieron 10 g de fenol grado reactivo en 100 mL de etanol al 95 %.

Reactivo 2: Se disolvieron 0.5 g de nitroprusiato de sodio ( $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 100 mL de agua desionizada.

Reactivo 3: Se mezcló 10 mL de solución alcalina (10 g de citrato de sodio + 0.5 g de hidróxido de sodio en 50 mL de agua desionizada) con 2.5 mL de hipoclorito de sodio comercial.

#### ***6.4.2 Textura por el método de Bouyoucus***

1. Se pesó en un vaso de agitación 40 g de suelo seco tamizado con malla de 2 mm.
2. Se le agregó 50 mL de solución dispersora (36.5 g de hexametáfosfato de sodio aforados con agua destilada a 1000 mL)
3. Se agregó agua destilada hasta la segunda marca del vaso y se dejó reposar 10 minutos.
4. Se agitó la suspensión en un agitador mecánico rotatorio durante 5 minutos y se transfirió la suspensión a una probeta de 1000 mL, la cual se aforó a 1000 mL con agua destilada.
5. Se agitó la suspensión con un agitador mecánico manual durante 20 segundos, se colocó un Hidrómetro de Bouyoucus ASTM-152-H y se leyó la primera lectura a

los 40 segundos. A las dos horas después se leyó la segunda lectura y se realizaron los siguientes cálculos.

$$\% A = 100 - (L.C. \times 2.5) \quad (10)$$

$$\% L = 100 - (\%A + \%R) \quad (11)$$

$$\% R = L'.C'. \times 2.5 \quad (12)$$

$$L.C. = L.H.S. - L.H.T. \quad (13)$$

$$L'.C'. = L'.H'.S'. - L'.H'.T'. \quad (14)$$

En donde:

A = Arena

L = Limo

R = Arcilla

L.C. = Lectura corregida a los 40 segundos

L'.C'. = Lectura corregida a los 120 min.

L.H.S. = Lectura del hidrómetro en la suspensión a los 40 seg

L'.H'.S'. = Lectura del hidrómetro en la suspensión a los 120 min

L.H.T. = Primera lectura del hidrómetro en el testigo a los 40 seg.

L'.H'.T'. = Segunda lectura del hidrómetro en el testigo los 120 min

### 6.5 Supervivencia e integridad de *Scytonema* en suelo

Se observaron muestras de *Scytonema ocellatum* en microscopios de contraste de fases Nikon UFX y Olympus BX41, a 10X, 20X y 40X para medir la integridad y supervivencia de *Scytonema* en suelo. Se utilizó un sistema de análisis de imágenes Image Pro Plus versión 4.5.19 para tomar fotografías. Los parámetros de supervivencia que se consideraron fueron: color, filamentos completos y hormogonios. Los parámetros de integridad celular fueron: células compartimentalizadas e isodiamétricas y heterocistos, y la integridad de filamentos: filamento completo, longitud, yemas y ramificaciones.



### **6.6 Análisis Estadísticos**

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) en el caso de comparar más de dos variables y el análisis de t de Student cuando se compararon 2 variables. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey para distinguir diferencias entre tratamientos. El nivel de probabilidad menor o igual a 0.05 fue considerada estadísticamente diferente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Optimización de la producción de biomasa de *S. ocellatum*

#### 7.1.1 Medidas de crecimiento

##### **Correlaciones**

El crecimiento fue medido a través del peso seco, clorofila a, volumen celular empaquetado (*VCE*) y diámetro de la colonia con la finalidad de correlacionarlos y establecer que determinaciones son más confiables (Tabla II). La correlación máxima se encontró para la determinación peso seco (mg) y el *VCE* (mL) con valor de  $R^2=0.90$  (Fig. 5-A), seguida por la correlación potencial del peso seco (mg) y el diámetro de las colonias (mm) ( $R^2=0.85$ ) (Fig. 5-B), la correlación más baja se presentó entre peso seco (mg/mL) y clorofila a ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $R^2=0.72$ ) (Fig. 5-C). Debido a estos valores, en el presente trabajo se utilizó el *VCE* para las mediciones de crecimiento de biomasa y posteriormente se calculó el peso seco. Esto fue una gran ventaja ya que la biomasa siguió activa después de haber sido medida y se pudo re-inocular.

Tabla II. Valores de correlación entre distintas medidas de crecimiento.

Medidas de Crecimiento	$R^2$
Peso seco (mg/mL) vs Clorofila a ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.72
Peso seco (mg) vs Diámetro de la colonia (mm)	0.85
Peso seco (mg) vs Volumen Celular Empaquetado (mL)	0.91

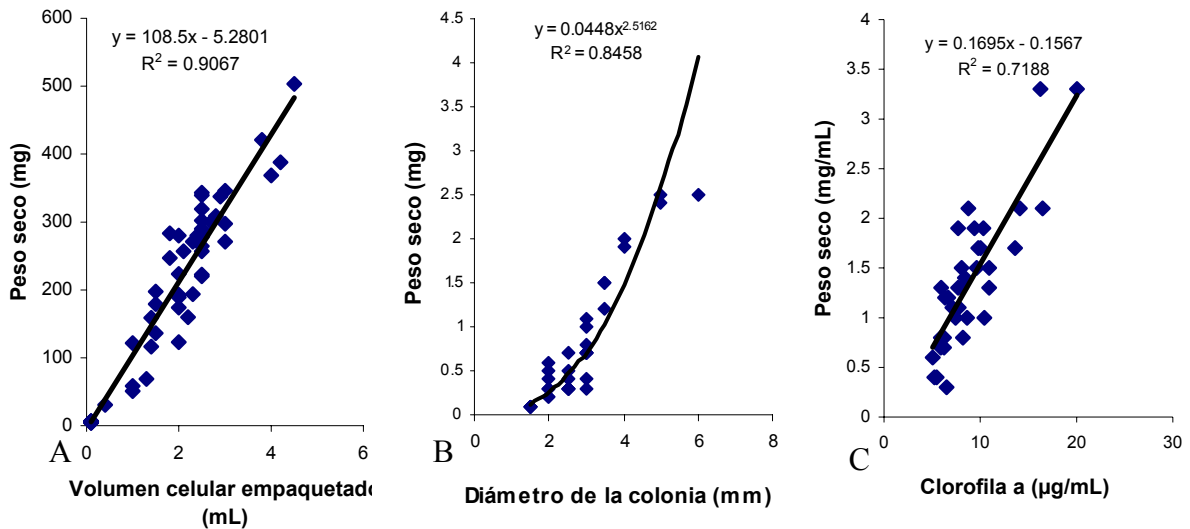


Figura 5. Gráficas de correlación de las medidas de crecimiento de la biomasa de *Scytonema*. A) Peso seco (mg) y Volumen Celular Empaquetado (mL); B) Peso seco (mg) y diámetro de las colonias (mm); C) Peso seco (mg/mL) y clorofila ( $\mu\text{g/mL}$ ). Las condiciones de incubación de las muestras a las que se les midió clorofila fueron: temperatura de  $25 \pm 1$  °C, fotoperiodo 12/12 hrs luz/oscuridad, intensidad luminosa  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en agitador orbital.

#### ***Diámetro de las colonias de S. ocellatum***

En los tres tratamientos de recambio (0%, 35% y 70% de recambio) en sistema de agitación, las colonias con diámetros entre 1.0 y 2.0 mm fueron las más abundantes, presentándose los valores más altos el día 24 ( $p < 0.001$ ) (Anexo VI. Cuadro 1) (Fig. 6). La abundancia de las colonias entre 2 y 3 mm fue baja al principio pero incrementó su número al final del experimento. Las colonias mayores a 3 mm fueron las menos abundantes. Se observó que las colonias mayores a 4 mm de diámetro tienden a crecer en volumen pero no en número de colonias y requieren de una fuerte aireación para poder liberar filamentos que sean capaces de formar otras colonias.

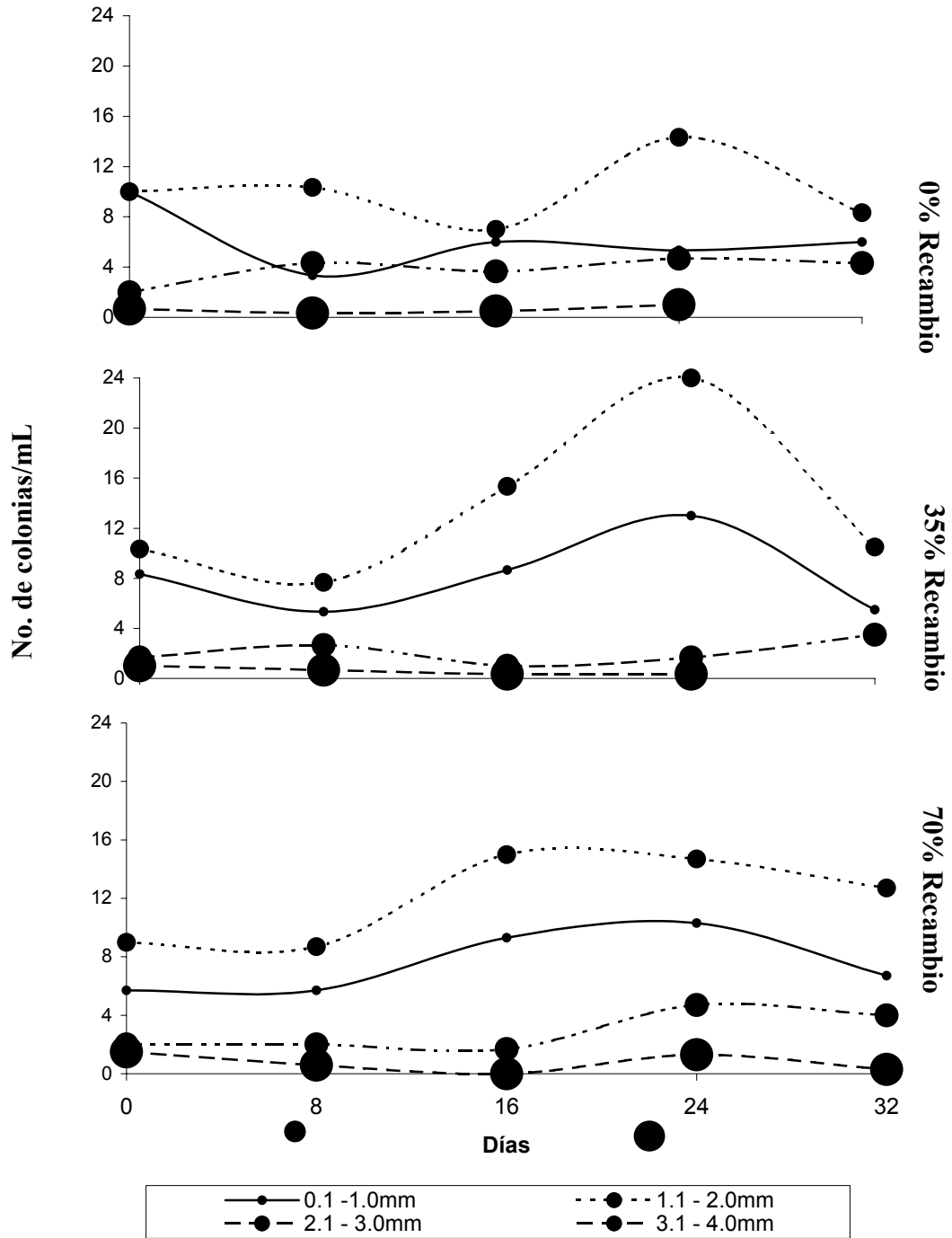


Figura 6. Diámetro y número de colonias de *Scytonema ocellatum* incubadas en matraces de 500 mL bajo tres tratamientos de recambio de medio de cultivo.

### 7.1.2 Factores que afectan la velocidad de crecimiento

#### Recambio del medio de cultivo

Los tratamientos de porcentaje de recambio (0 %, 35 % y 70 %) del medio de cultivo en el sistema de agitación, no presentaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento poblacional (K) (Fig. 7) aunque sí se observa una marcada tendencia a favor del tratamiento con 70 % de recambio.

Las cinéticas de crecimiento para cada tratamiento de recambio de medio de cultivo, en matraces de 500 mL en sistema de agitación orbital (Fig. 8), mostraron que a los 24 días dejaron de crecer, independientemente del porcentaje de recambio.

Los tratamientos con 0 y 70 % de recambio se mantuvieron en fase estacionaria a partir del día 24; mientras que el tratamiento con 35 % de recambio presentó una disminución en la biomasa.

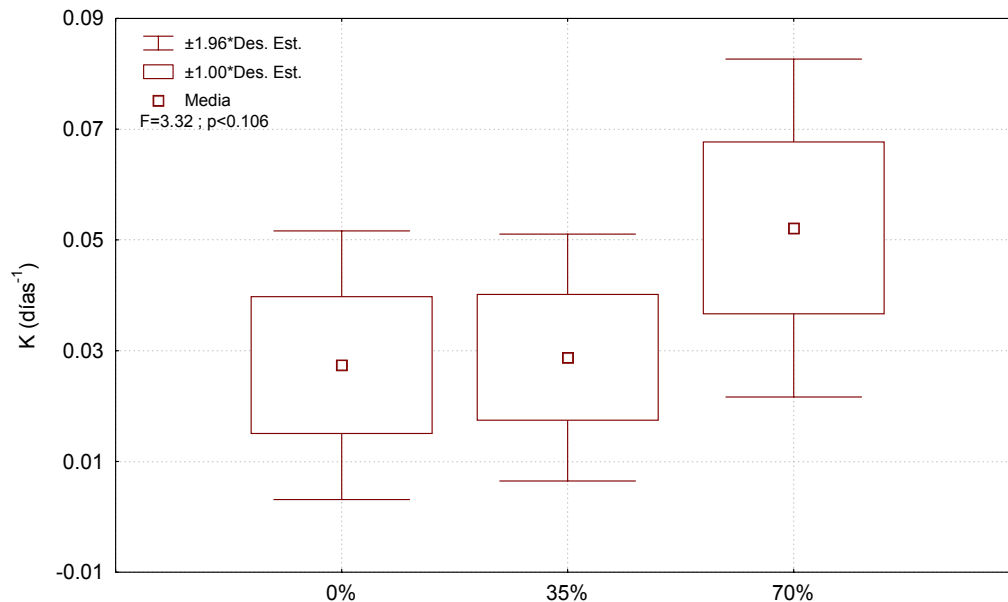


Figura 7. Velocidad de crecimiento poblacional (K) bajo tres tratamientos de porcentaje de recambio del medio de cultivo  $Z8^0$ , en sistema de agitación con fotoperiodo de 12/12 hrs, intensidad de luz  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

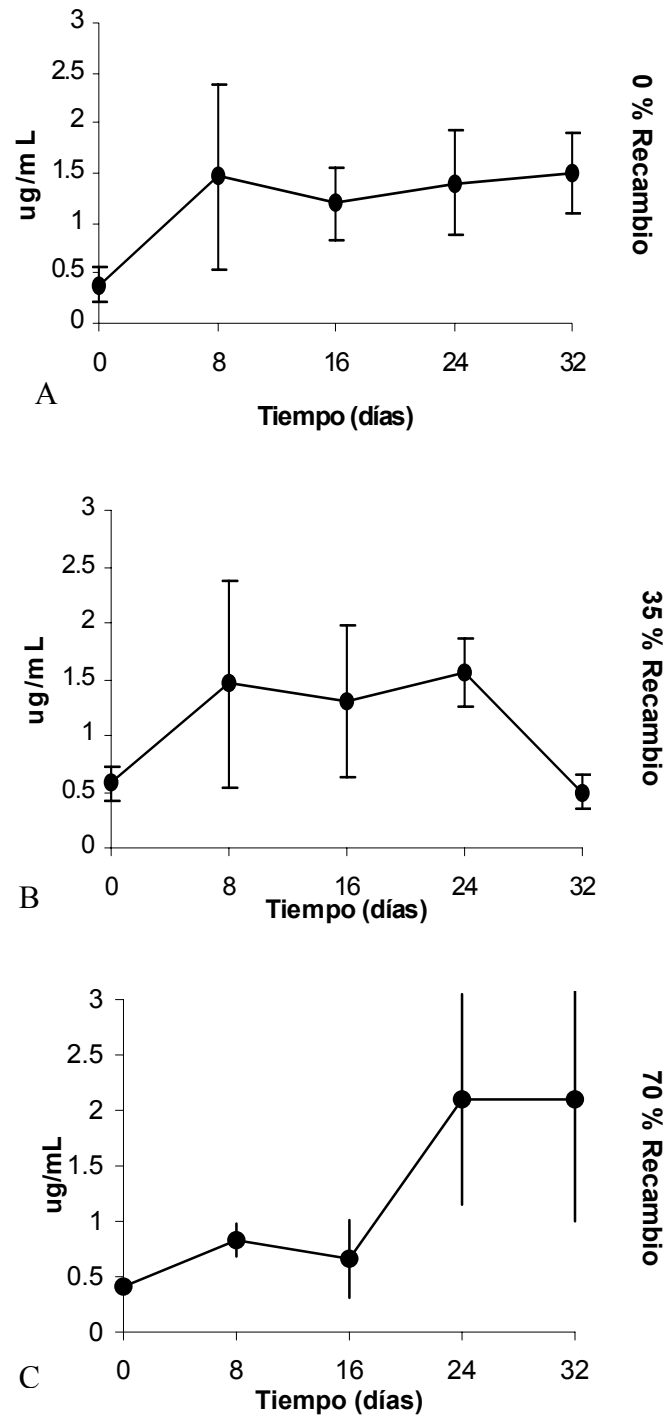


Figura 8. Cinéticas de crecimiento de los cultivos de *S. ocellatum* bajo 3 tratamientos de porcentaje de recambio del medio de cultivo Z8<sup>0</sup>. A) 0 % de recambio; B) 35 % de recambio; C) 70 % de recambio. Cultivo en agitación con fotoperiodo de 12/12 hrs luz/oscuridad, intensidad de luz  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , en matraces de 500 mL.

***Incubación con diferentes concentraciones de fuente de nitrógeno***

Los resultados no mostraron diferencia significativa en la producción final de biomasa entre los cultivos de *S. ocellatum* incubados en medio Z8 con 3 concentraciones de NO<sub>3</sub> (Tabla III). No obstante, hay una clara tendencia a aumentar la producción de biomasa en medios de cultivo con fuente de nitrógeno, la cosecha de biomasa en Z8<sup>0</sup> se recomienda porque reduce el 37% del costo del medio de cultivo.

Tabla III. Producción de biomasa seca de *Scytonema ocellatum* incubada en medio de cultivo Z8 con 3 diferentes proporciones de compuestos nitrogenados.

Medio de cultivo	K (días <sup>-1</sup> )	Biomasa seca (mg/L ± d.e.)
Z8	0.067	1586.053 ± 225
Z8 <sup>1/2</sup>	0.068	1586.053 ± 165
Z8 <sup>0</sup>	0.065	1441.387 ± 313

Z8 (con NaNO<sub>3</sub> y Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), Z8<sup>1/2</sup> (con la mitad de la concentración de NO<sub>3</sub> del Z8), Z8<sup>0</sup> (sin fuente de NO<sub>3</sub>), velocidad de crecimiento poblacional (K), desviación estándar (d.e.).

***Cultivo en sistema de aireación***

Se compararon dos sistemas de cultivo: agitación y aireación, ambos bajo las mismas condiciones ambientales de temperatura, intensidad de luz y fotoperiodo. En la Tabla IV se observa que las velocidades de crecimiento K (días<sup>-1</sup>) fueron similares e incluso más altas en los cultivos incubados en sistema de aireación con 10 % de recambio de medio que en los cultivos en sistema de agitación orbital con 70 % de recambio.

Tabla IV. Dos sistemas de cultivo: agitación y aireación.

Sistema de Cultivo	Vol. Biorreactor (L)	Recambio (%)	tg (días $\pm$ d.e.)	K (días <sup>-1</sup> $\pm$ d.e.)
Agitación	0.5	70	21.9 $\pm$ 8.88	0.041 $\pm$ 0.01
Aireación	1.0	10	14.7 $\pm$ 0.68	0.065 $\pm$ 0.01
	2.0	10	23.3 $\pm$ 1.87	0.041 $\pm$ 0.003

Condiciones de cultivo: temperatura 25 $\pm$ 1 °C, intensidad de luz 100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 12/12 horas. Tiempo de generación (tg), velocidad de crecimiento poblacional (K), porcentaje de recambio del medio de cultivo Z8<sup>0</sup> (Recambio %), desviación estándar (d.e.).

### ***Condiciones de incubación***

En la Tabla V se comparan 3 condiciones de incubación de cultivos en botellas de vidrio transparente. Se observó que las colonias que se incubaron a 20 °C crecieron en volumen pero no en número, y su velocidad de crecimiento (K) fue la más baja (0.012 días<sup>-1</sup>). Entre la condición 1 y 3, se observa que una mayor temperatura (25 °C) incrementó K y disminuyó el tiempo de generación (tg) de una manera considerable. Sin embargo, en la condición 2, con una temperatura intermedia (23°C) y una de intensidad luminosa de 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  e iluminación constante (24 horas), la velocidad de crecimiento (K) fue significativamente mayor y el tg fue menor que las condiciones 2 y 3.

Por otro lado, se observó una fotoinhibición en los cultivos sometidos a intensidades de luz mayores a 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  en matraces de vidrio (datos no incluidos).



Tabla V. Condiciones de incubación de cultivos de *Scytonema ocellatum*.

Condiciones de Incubación	T °C	Foto periodo	Intensidad de Luz ( $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	tg (días $\pm$ d.e.)	K (días <sup>-1</sup> $\pm$ d.e.)	Biomasa final (g)
1	20	12/12	90	85.25 $\pm$ 7.17	0.012 $\pm$ 0.02	1.23
2	23	24	200	6.08 $\pm$ 0.15	0.166 $\pm$ 0.14	2.06
3	25	12/12	100	52.89 $\pm$ 10.4	0.019 $\pm$ 0.09	1.67

Tiempo de generación (tg), velocidad de crecimiento poblacional (K), desviación estándar (d.e.).

### ***Tiempos de incubación y tamaño del inóculo***

El tiempo óptimo de cosecha en los cultivos de volúmenes menores a 500 mL, con recambio del 10% del medio de cultivo, fue alrededor de los 26 días (Figura 9). Antes y después de este tiempo (35 y 42 días) la velocidad de crecimiento fue menor.

En la Tabla VI se muestran los valores de la relación volumen celular empaquetado-volumen del medio de cultivo. El tiempo de incubación fue hasta de 28 días ya que se observó que la velocidad máxima de crecimiento poblacional ocurría alrededor de los 26 días (Fig. 9). Se observó que un inóculo pequeño en relación al volumen de medio de cultivo (1:1800; 1:300) crecía a una velocidad mayor que un inóculo grande en el mismo periodo de tiempo, independientemente de la capacidad volumétrica del contenedor.

Se encontró que independientemente del tamaño del inóculo, la densidad de biomasa máxima de *Scytonema* que puede contener un biorreactor de 1 L, era de 35 mL/L (*VCE*) ó 3.8 g/L (peso seco), bajo condiciones de 24 horas de luz, intensidad luminosa de 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , aireación constante, 23  $\pm$  1°C y 10% de recambio de medio de cultivo (Fig. 10).

### 7.1.3 Escalamiento

Se encontró un tiempo de generación (tg) de 6 días y una velocidad de crecimiento (K) de  $0.16 \text{ días}^{-1}$  en volúmenes menores a 2 L. En volúmenes de 15 L (bolsa de plástico) y 19 L (garrafón), el tg aumentó a 15.8 días y 19.77 días respectivamente mientras que la K disminuyó a  $0.063 \text{ días}^{-1}$  y  $0.051 \text{ días}^{-1}$  respectivamente (Tabla VII). Los volúmenes de 15 y 19 L no presentaron diferencias significativas ( $p < 0.22$ ).

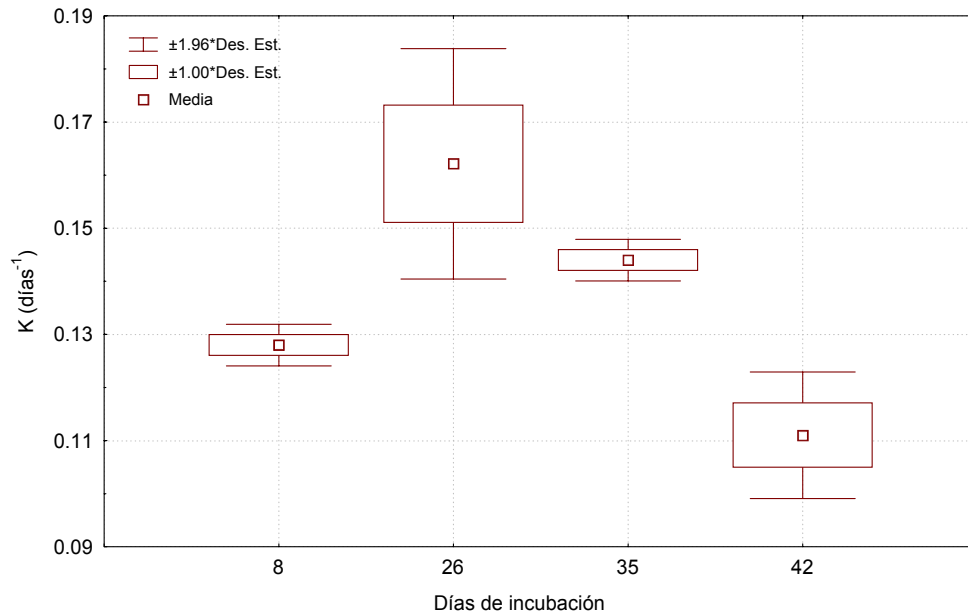


Figura 9. Velocidad de crecimiento poblacional (K) de *S. ocellatum* en 4 tiempos de incubación. Cultivos en matraces de volúmenes menores a 500 mL con medio de cultivo Z8<sup>0</sup>, 24 horas de luz, intensidad de luz  $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , aireación constante y temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Tabla VI. Valores de la relación volumen celular empaquetado-volumen del medio de cultivo. Tiempo de generación (tg) y velocidad de crecimiento poblacional (K) de cultivos de hasta 28 días de incubación.

Vol. del matraz (mL)	VCE* (mL)	Vol. de Medio de cultivo (mL)	Días de incubación	tg (días)	K (días <sup>-1</sup> )
2000		1:1800	26	6.08	0.166
500		1:300	26	6.29	0.160
1000		1: 66	28	22.9	0.044
1000		1:50	22	27.24	0.037
1000		1:36	26	80.75	0.012

\*Volumen Celular Empaquetado (VCE)

Condiciones de cultivo: medio de cultivo Z8<sup>0</sup>, 24 horas de luz, intensidad luminosa de 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , aireación constante y 23±1 °C .

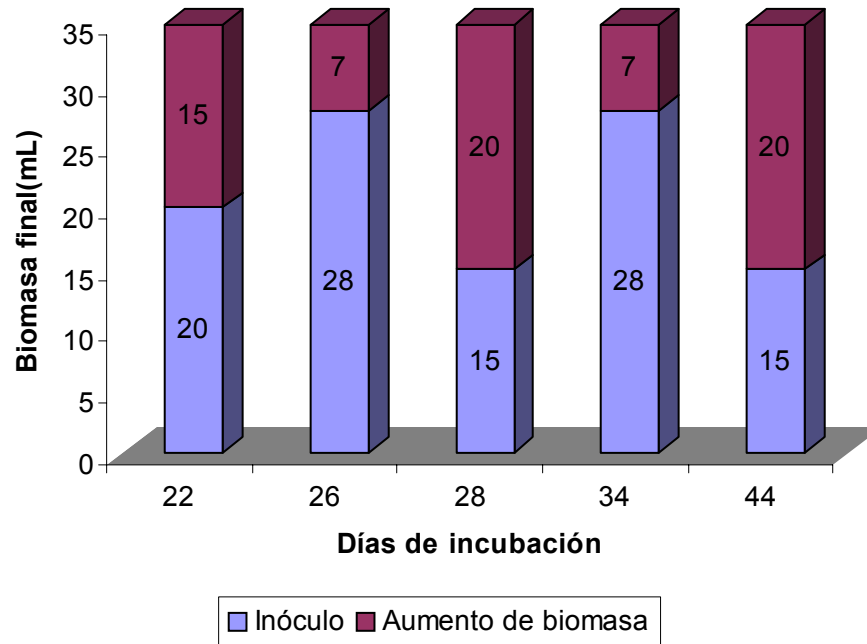


Figura 10. Producción máxima de biomasa de volumen celular empaquetado en fotorreactores de 1L. Bajo condiciones de 24 horas de luz, intensidad luminosa de 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , aireación constante, 23±1 °C y 10 % de recambio de medio de cultivo.

Tabla VII. Velocidad de crecimiento (K) y tiempo de generación (tg) en biorreactores de diferente capacidad volumétrica.

Volúmenes de biorreactores	Parámetros de Crecimiento	
	K (días <sup>-1</sup> ± d.e.)	tg (días ± d.e.)
0.5 L	0.162 ± 0.25	6.25 ± 0.46
2.0 L	0.166 ± 0.14	6.08 ± 0.15
15.0 L*	0.063 ± 0	15.8 ± 0
19.0 L**	0.051 ± 0.006	19.77 ± 2.45

Velocidad de crecimiento poblacional (K), tiempo de generación (tg)

Las condiciones de crecimiento fueron 24 horas de luz, 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , aireación constante, 23±1°C, y se incubaron durante 25 días en promedio.

\*Bolsa de plástico transparente incubada con intensidad de luz de 175  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

\*\*Garrafón de plástico azul incubado con intensidad de luz de 500  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### ***Cinética de crecimiento en garrafones de 19 L***

Se realizó una cinética de crecimiento en garrafones de 19 L en sistema de aireación, con recambio del 10% del medio de cultivo cada tercer día (Fig. 11 y 12). La Figura 11, muestra un incremento en la biomasa, representado en peso seco hasta el día quince. Entre el día quince y el dieciocho disminuyó y después se mantuvo en fase estacionaria durante 10 días más. Los muestreos que se hicieron mostraron que la biomasa se mantuvo en un intervalo de densidad entre 100-150 mg/L (peso seco) y que crecieron a una tasa de 44 mg/L día. De las cinco repeticiones que se hicieron (Fig. 12), el garrafón B presentó cambios bruscos en el crecimiento, posiblemente debido a un error de muestreo derivado de las características de peso y densidad de las colonias en el cultivo, por lo que no se consideró para el análisis de la cinética de crecimiento.

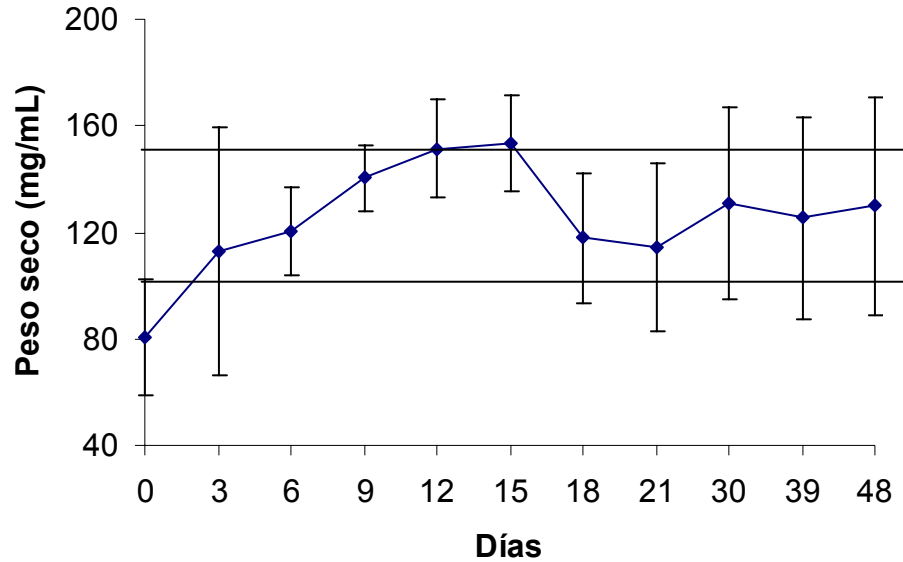


Figura 11. Cinética de Crecimiento de *Scytonema ocellatum* en Garrafrones de 19 L con medio Z8<sup>0</sup>, 24 horas luz, intensidad luminosa de 30  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura de  $26\pm 1^\circ\text{C}$ .



Figura 12. Cultivo de *Scytonema ocellatum* en garrafrones de 19 L en sistema de aireación, 24 hrs luz, intensidad de luz de 30  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura de  $26\pm 1^\circ\text{C}$  y medio de cultivo Z8<sup>0</sup>. A, B, C, D y E son repeticiones. B y C presentan colonias más pesadas y compactas que el resto de las repeticiones.

## 7.2 Efecto de *S. ocellatum* en la Retención de Humedad

### 7.2.1 Retención de agua y partículas de suelo por *Scytonema ocellatum*

Se observó que las láminas secas de *S. ocellatum* absorben agua y aumentan de tamaño cuando se hidratan (Fig. 13). La lámina seca pesó 11.81 g; después de hidratarla con 80 mL de agua destilada, absorbió 5.6 veces su peso en agua y pesó 62.19 g.



Figura 13. Lámina de *Scytonema ocellatum* A) Lámina seca midiendo 9.5 cm en el tope, 10 cm en la base, 8 cm en lado derecho y 8 cm en el izquierdo. B) Lámina de *Scytonema ocellatum* hidratada con 80 mL de agua destilada que mide 10.2 cm en el tope, 11.2 cm en la base, 9 cm en el lado derecho y 9.2 cm en el izquierdo.

Las láminas de *Scytonema ocellatum* aplicadas al campo, retuvieron partículas de suelo por arriba y por debajo de ellas (Fig. 14). La Figura 15a y 15b muestra partículas de suelo atrapadas en filamentos secos y húmedos de *Scytonema*.



Figura 14. Lámina de *Scytonema* con partículas de suelo adheridas en la superficie.

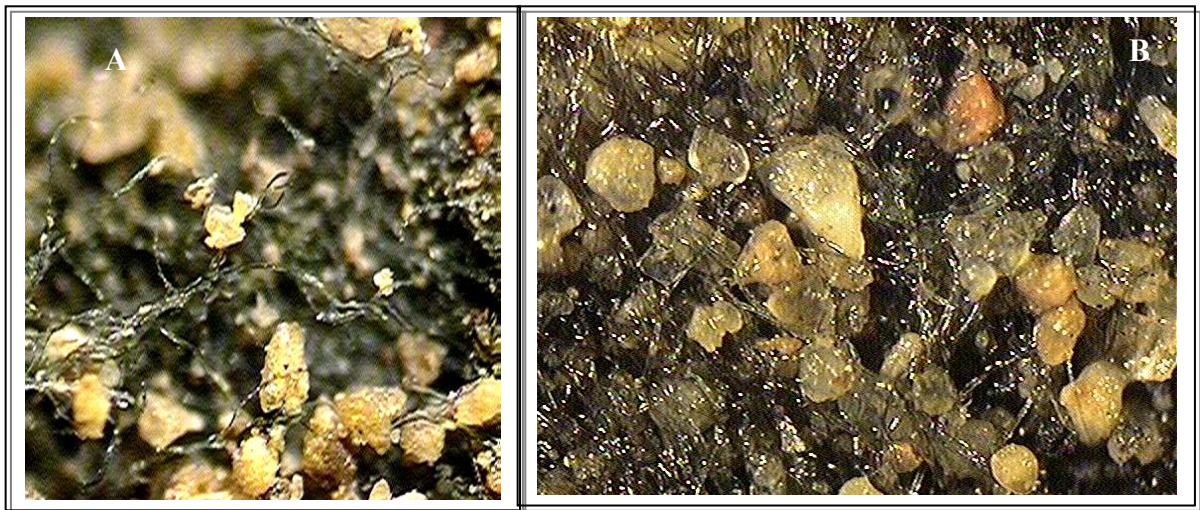


Figura 15. Partículas de suelo atrapadas en filamentos de *Scytonema*. A) Filamentos secos. B) Filamentos húmedos.

### 7.2.2 Retención de humedad en macetas

Los resultados de retención de humedad en suelos tratados con *Scytonema* y sin ella (control) son mostrados en la Figura 16. Del tercero al decimoquinto día se observa una tendencia en donde los tres tratamientos con cianobacteria exhiben valores mayores de porcentaje de humedad cuando se comparan con el control. En el noveno y doceavo día la densidad alta de *Scytonema* retuvo en promedio 21.82% más humedad que el control, al decimoquinto día bajó a 13.32%.

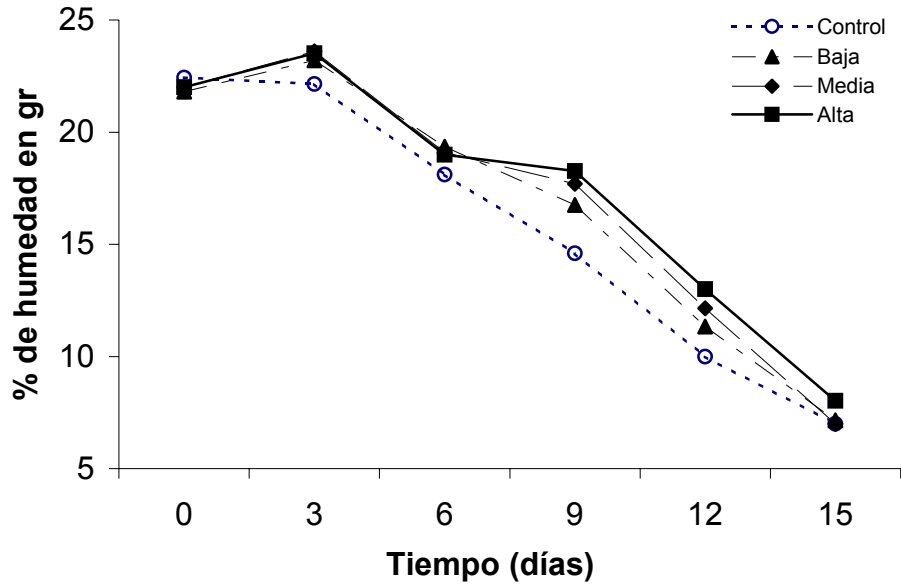


Figura 16. Porcentaje de retención de humedad en suelos tratados con diferentes densidades de *S. ocellatum* contenida en macetas.

En el tercer día, se observó un aumento en el porcentaje de humedad en los tratamientos con *Scytonema* a pesar de que se regaron una sola vez al inicio del experimento.

### 7.2.3 Retención de humedad en campo

Los porcentajes de retención de humedad en los cuatro tratamientos de cobertura orgánica del suelo (control, mantillo de frijol gandul, cobertura completa y parcial con *Scytonema*), no presentaron diferencias significativas en profundidades de 0 a 15 cm ( $p < 0.48$ ) ni de 15 a 30 cm. Por esta razón se juntaron los datos y se analizó la diferencia de humedad en el suelo entre profundidades. En la Figura 17 se observa que en las dos profundidades (0-15 y 15 a 30 cm), el porcentaje de humedad en el suelo descendió el 50% en tan solo dos días. De 0-15 cm, descendió una cuarta parte en cinco días. En la profundidad de 15 a 30 cm, siguió bajando ligeramente los 3 días siguientes y después se mantuvo estable en 8% hasta el día 11.



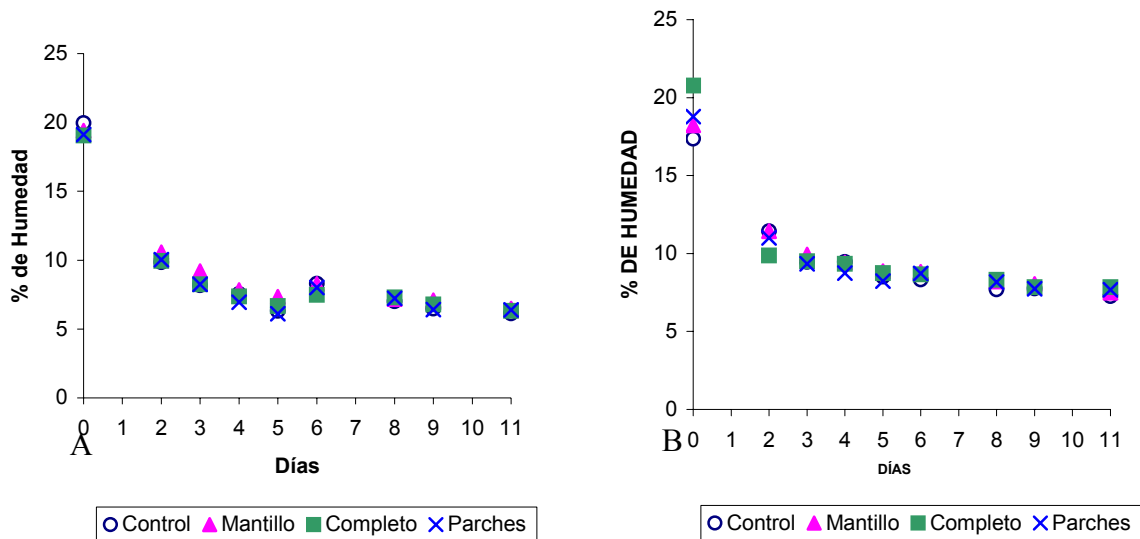


Figura 17. Porcentaje de humedad del suelo tratado con diferentes coberturas orgánicas. A) profundidad de 0-15 cm, B) profundidad de 15-30 cm.

#### 7.2.4 Contenido de amonio y nitrato en el suelo

No se presentaron diferencias significativas en el contenido de amonio ( $p < 0.20$ ) ni de nitrato ( $p < 0.72$ ) entre los tratamientos de cobertura orgánica (mantillo, *Scytonema* completo, *Scytonema* parches) en el suelo del campo agrícola, tanto en la profundidad de 0 a 15 cm como de 15 a 30 cm (Anexo VI).

#### 7.2.5 Temperatura de suelo en campo

El 3 de julio del 2003 se hizo una medición de la temperatura del suelo a las 15:30 hrs, se registraron las temperaturas de las coberturas orgánicas, de la superficie del suelo (debajo de las coberturas), de 1 y 2 cm de profundidad (Fig. 18). Estadísticamente, el mantillo resultó ser el tratamiento que mantiene el suelo con temperaturas más bajas. Los valores

más altos de temperatura se registraron en la superficie del suelo y en la superficie de las láminas de *Scytonema*.

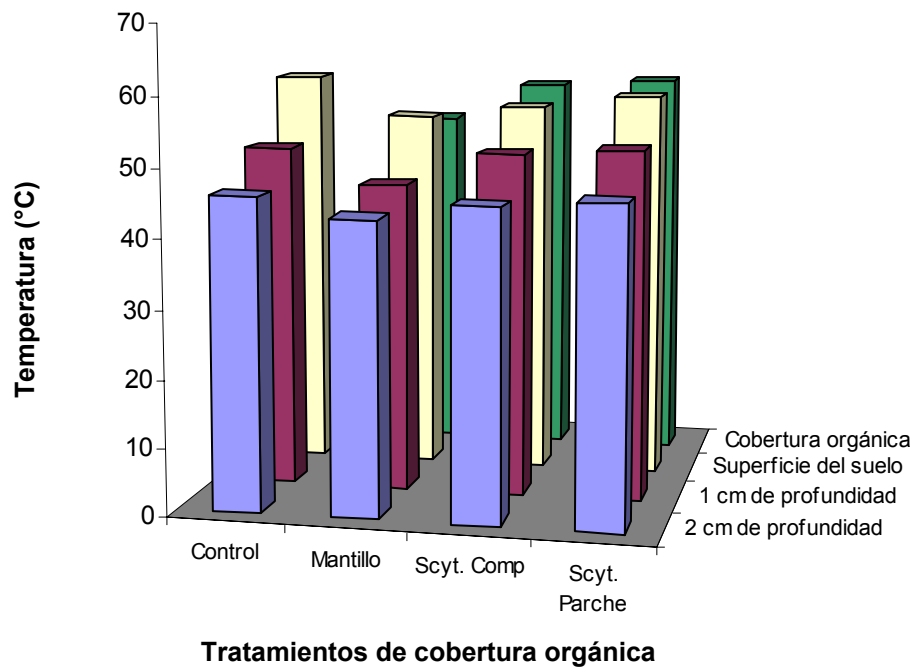


Figura 18. Comparación de temperaturas del suelo a distintos niveles, bajo tratamientos de coberturas orgánicas.

### 7.3 Valoración Agrobiológica de *S. ocellatum* en plantas de chile

#### 7.3.1 Contenido de clorofila total en hojas de chile

El contenido de clorofila total presentó diferencias significativas entre los tratamientos de sustrato y riego (Fig. 19). Los sustratos regados con fertilizante (*SunFert* y *MixFert*) presentaron valores mayores a los sustratos regados con agua (*SunAgua* y *MixAgua*) ( $p < 0.001$ ), y el *SunAgua* presentó valores mayores que el sustrato *MixAgua* ( $p < 0.001$ ).

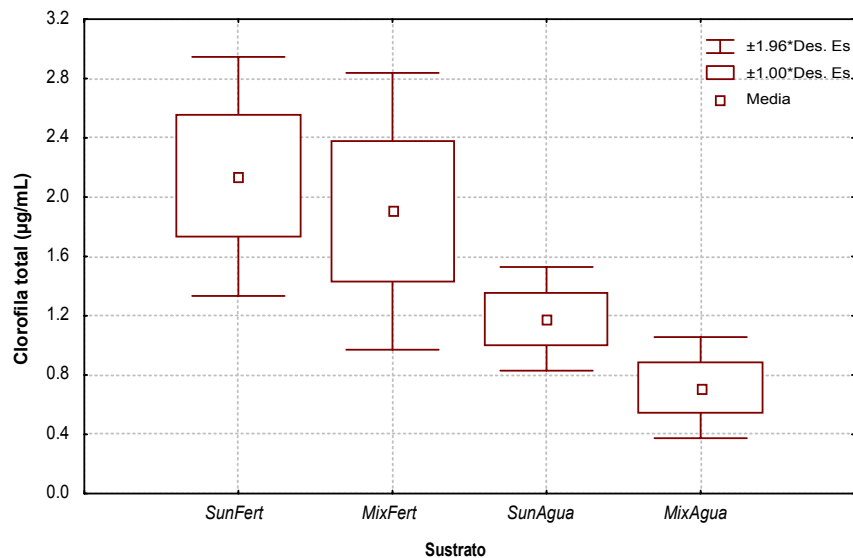


Figura 19. Clorofila total en hojas de chile crecidos bajo 4 combinaciones de sustrato y riego: *SunFert* (sustrato Sunshine con fertilizante); *MixFert* (sustrato mixto (30% Sunshine-70% suelo) con fertilizante); *SunAgua* (sustrato Sunshine con agua); *MixAgua* (sustrato mixto (30% Sunshine-70% suelo) con agua).

La Figura 20 muestra el contenido de clorofila total en hojas de chile crecidos en 6 tratamientos de aplicación de *Scytonema* y cuatro combinaciones de sustrato y agua. Dentro de la combinación de sustrato y riego *SunFert* se presentó una diferencia significativa

( $p < 0.017$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias dentro de las combinaciones *SunAgua* ( $p < 0.803$ ), *MixFert* ( $p < 0.166$ ) y *MixAgua* ( $p < 0.107$ ) (Anexo VI).

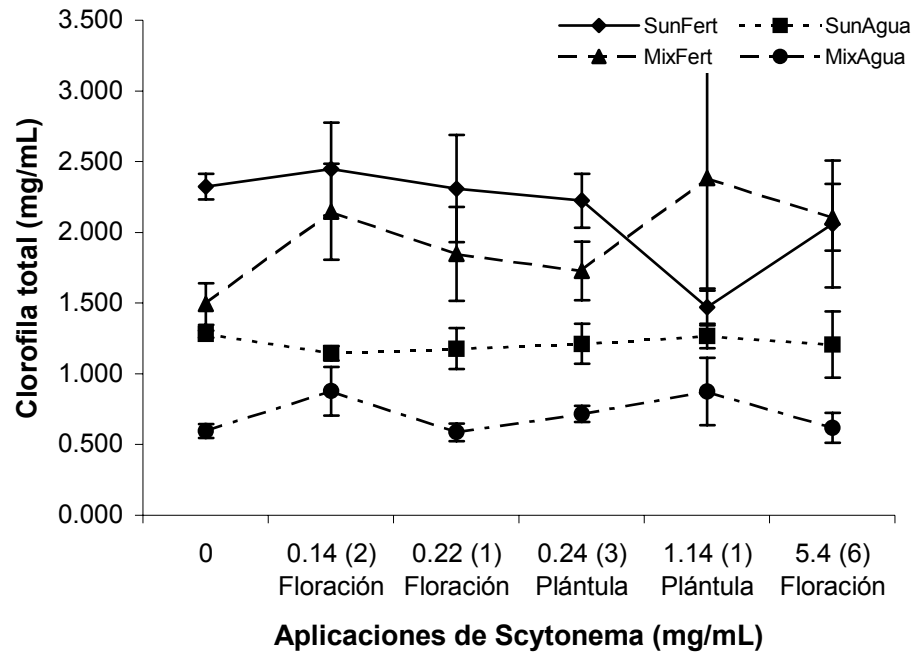


Figura 20. Contenido de clorofila total en hojas de chile crecidos en 6 tratamientos de aplicación de *Scytonema* (mg/mL) y cuatro combinaciones de sustrato-riego: *SunFert* (sustrato Sunshine-Fertilizante); *SunAgua* (Sunshine-Agua); *MixFert* (sustrato Mixto-Fertilizante) y *MixAgua* (Mixto-Agua). Entre paréntesis se indica el número de aplicaciones y debajo se indica la etapa en que se aplicó.

### 7.3.2 Contenido de Proteína en frutos de chile

Las gráficas de las Figuras 21, 22 y 23 muestran una comparación entre los factores principales (aplicaciones de *Scytonema*, tipo de sustrato y tipo de riego), en la Figura 24 se muestran las gráficas de la interacción de los tres factores. Los tratamientos de aplicación de *Scytonema* en las macetas con chile, presentaron diferencias significativas ( $p < 0.035$ ) con

respecto al control, en todas las combinaciones de sustrato y riego (Fig. 21). Se observa un marcado aumento en el porcentaje de proteína en el tratamiento de 3 aplicaciones de *Scytonema* a partir de la etapa de plántula. En la Figura 22, se observa que todos los tratamientos con cianobacteria (excepto 2 aplicaciones de 0.22 mg/mL a partir de etapa de floración) presentaron mayor porcentaje de proteína en frutos de chile en el sustrato mixto, independientemente del riego (Fertilizante o Agua). La Figura 23, muestra también una marcada diferencia entre el tipo de riego, en donde se muestra un mayor porcentaje de proteínas en los tratamientos con aplicaciones de cianobacterias regadas con agua (excepto el control y 2 aplicaciones de 0.22 mg/mL en etapa de floración).

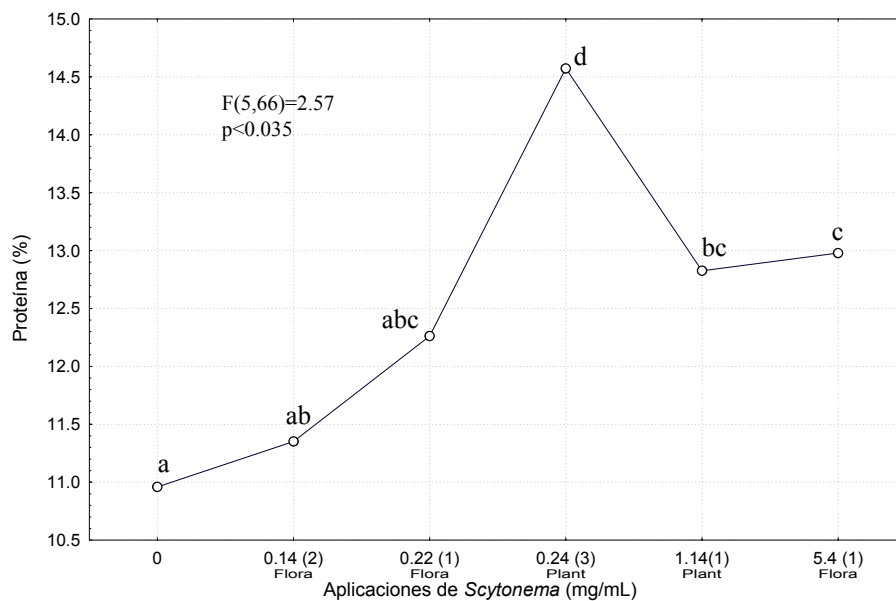


Figura 21. Efecto de la concentración de *Scytonema* en el porcentaje de proteína de frutos de chile crecidos en 2 tipos de sustrato (Sunshine y Mixto) y riego (Fertilizante y Agua). Entre paréntesis se indica el número de aplicaciones y debajo la etapa de la planta en que fue aplicada (Flora: Floración; Plant: Plántula). Las letras indican medias diferentes por la prueba de Tukey.

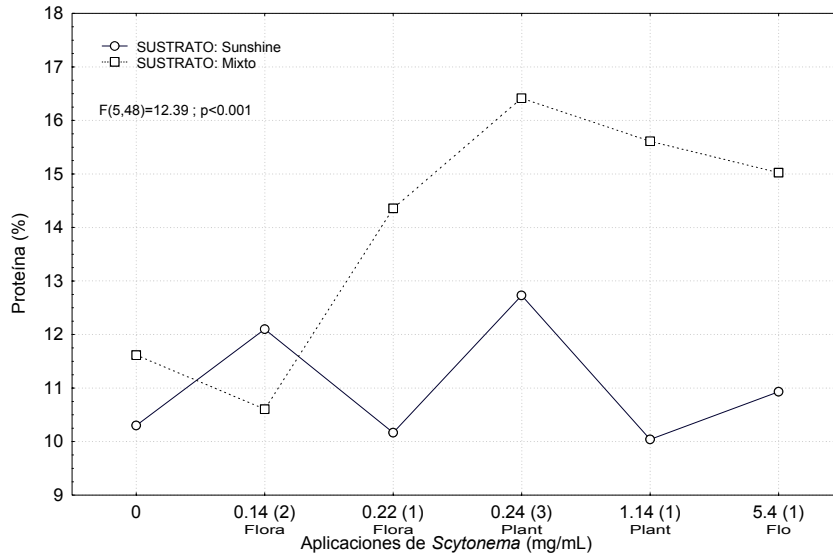


Figura 22. Efecto de la concentración de *Scytonema* en el porcentaje de proteína cuando se aplica en sustrato 100% orgánico (Sunshine) y 30% orgánico + 70% franco arenoso (Mixto). Entre paréntesis se indica el número de aplicaciones y debajo la etapa

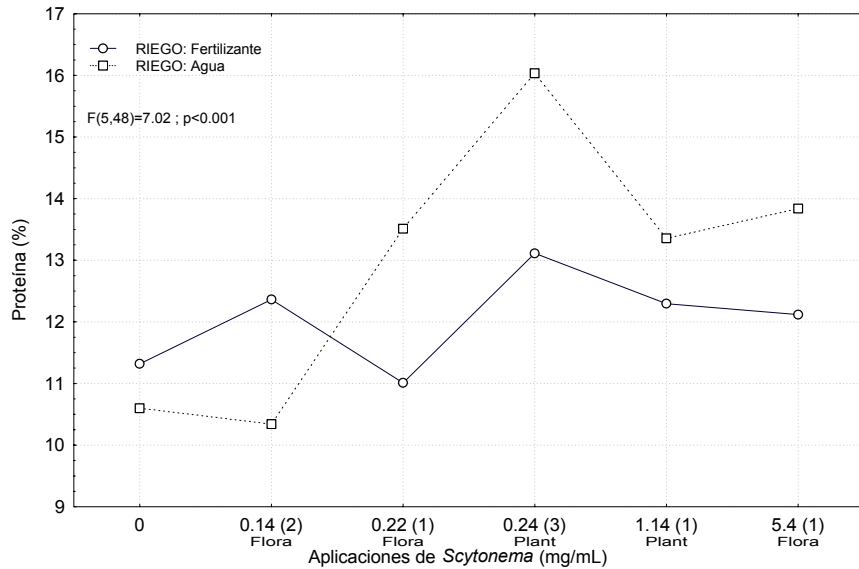


Figura 23. Efecto de la concentración de *Scytonema* en el porcentaje de proteína cuando se riega con Fertilizante y Agua. Entre paréntesis se indica el número de aplicaciones y debajo la etapa.

La Figura 24 muestra la interacción del tipo de sustrato, riego, cantidad y etapa de aplicación de biomasa de cianobacterias en el suelo con plantas de Chile. En donde se observa que los valores mayores de porcentaje de proteína se encuentran en el sustrato mixto regado con agua cuando se inocula *Scytonema*, y los más bajos en el sustrato Sunshine regado con agua. Cuando los sustratos se riegan con fertilizante, la diferencia entre ellos no es tan grande como en el riego con agua, pero se vuelve a observar un porcentaje mayor de proteína de los frutos en el sustrato mixto.

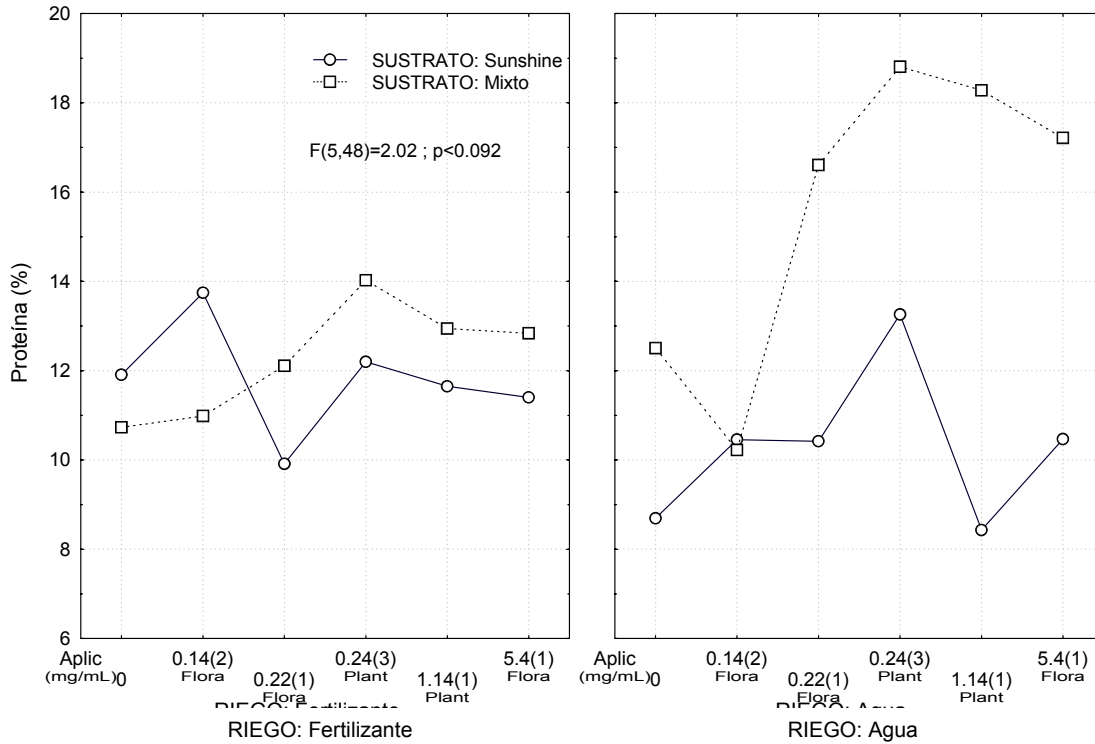


Figura 24. Efecto de la interacción de las variables riego (Fertilizante y Agua), sustrato (Sunshine y Mixto) y aplicación de *Scytonema* (mg/mL) en el porcentaje de proteína en los frutos de Chile. Entre paréntesis se indica el número de aplicaciones y debajo se indica la etapa de aplicación.

### 7.3.3 Frutos de chile

El análisis estadístico de la producción de chiles se hizo utilizando los chiles de la primera cosecha. La longitud, peso fresco y peso seco de los frutos de chile no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de aplicación de *Scytonema*, dentro de cada combinación de sustrato y riego (Anexo VI). Debido a esto, los valores promedio y desviación estándar de las mediciones de los chiles, se agruparon por combinación de sustrato-riego como se muestra en la Tabla VIII. Los frutos con sustrato Sunshine fueron más grandes ( $p < 0.001$ ) y pesados (peso fresco) ( $p < 0.003$ ) que los chiles crecidos en sustrato mixto; por otra parte, el sustrato mixto-fertilizante presentó valores más altos en longitud ( $p < 0.001$ ) y peso fresco ( $p < 0.001$ ) que los del mixto-agua (Anexo VI). En cuanto al peso seco, el valor significativamente más alto se presentó en el sustrato Sunshine-fertilizante, mientras que los frutos de los sustratos Sunshine-agua y mixto-fertilizante no fueron estadísticamente diferentes; el sustrato mixto-agua presentó los valores más bajos de peso seco (Tabla VIII).

Tabla VIII. Mediciones en frutos de chile crecidos en 4 combinaciones de sustrato y riego.

		Frutos de chile		
Sustrato	Riego	Longitud (cm)	Peso Fresco (g)	Peso seco (g)
Sunshine (100% orgánico)	Fertilizante	10.20 <sup>c</sup> (1.7)	57.20 <sup>d</sup> (16.0)	4.74 <sup>c</sup> (1.8)
	Agua	10.13 <sup>c</sup> (1.5)	45.25 <sup>c</sup> (5.34)	3.89 <sup>b</sup> (0.6)
Mixto (30%-70% orgánico-suelo)	Fertilizante	8.60 <sup>b</sup> (1.4)	30.24 <sup>b</sup> (12.4)	3.08 <sup>b</sup> (1.2)
	Agua	3.98 <sup>a</sup> (1.5)	6.90 <sup>a</sup> (4.65)	0.57 <sup>a</sup> (1.9)
		$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Letras diferentes en las columnas tienen medias diferentes en la prueba estadística de Tukey (Desviación estándar)



### 7.3.4 Contenido de amonio en el sustrato

El análisis de amonio en el sustrato Mixto con Fertilizante no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con *Scytonema* y el control, tanto en los primeros cinco centímetros de la superficie (0-5 cm) ( $p < 0.24$ ) como los siguientes 10 cm (5-15 cm) ( $p < 0.24$ ) (Fig. 25). Los valores más altos se observaron en la superficie (0-5 cm), sin embargo al contrastar estadísticamente las dos profundidades no se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.14$ ) en el contenido de amonio, únicamente el tratamiento de aplicación 1.14 mg/mL fue significativamente diferente ( $p < 0.005$ ).

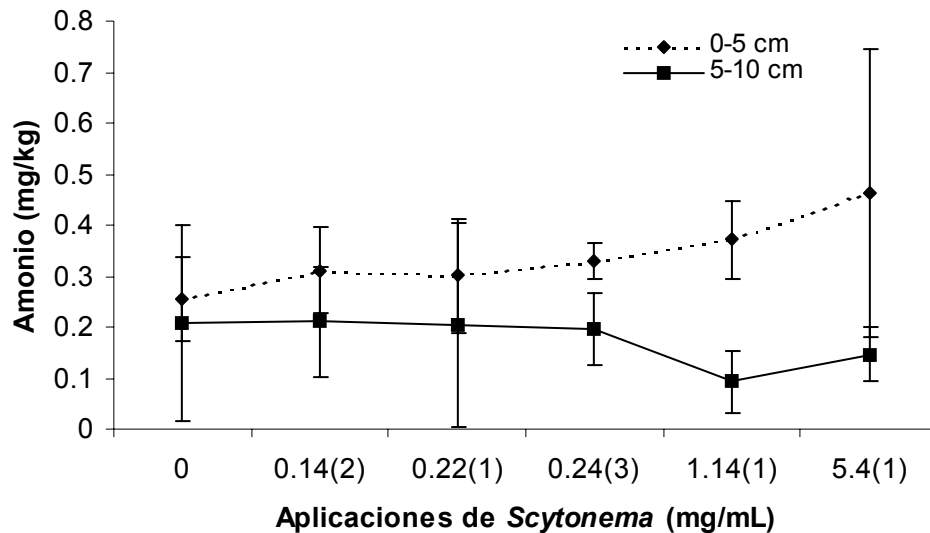


Figura 25. Amonio en sustrato mixto (30% Sunshine+ 70% suelo) regado con fertilizante e inoculado con *Scytonema*, a 2 profundidades: 0-5 cm y de 5-15 cm. Entre paréntesis se indica el número de veces que se aplicó *Scytonema*.

## 7.4 Sobrevivencia, Integridad y Reactivación de *Scytonema ocellatum* en el Suelo

### 7.4.1 En cultivo de chiles en macetas

En las macetas con sustrato Sunshine, se pudieron colectar colonias de *Scytonema* al inicio de los tratamientos de aplicación (Fig. 26), pero después de unos días fue difícil encontrarlas. Esto quizá se debe a que el sustrato orgánico que se utilizó (Sunshine # 3) es muy poroso y ligero. En cada riego la materia orgánica flotaba y cubría a las colonias, o fueron arrastradas por el agua a través de los poros del sustrato. Por otro lado, se observaron invertebrados con el tracto digestivo lleno y verde cerca de filamentos de *Scytonema* (Fig. 27). Se observó también que bacterias y hongos depredaban las colonias en un cultivo de suspensión de sustrato Sunshine y *Scytonema*, incubados en cajas Petri con YPD.

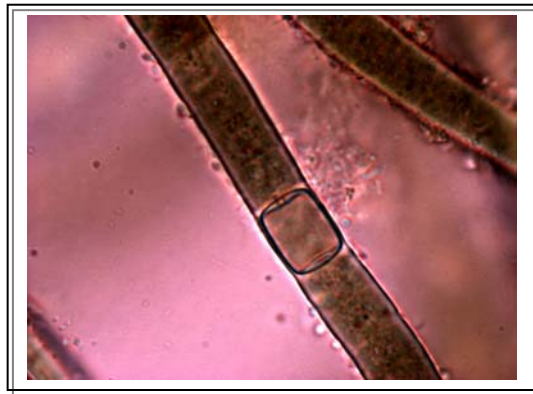


Figura 26. *Scytonema ocellatum* con heterocisto (40X) a 6 días de haber sido aplicada en 100% sustrato orgánico Sunshine.

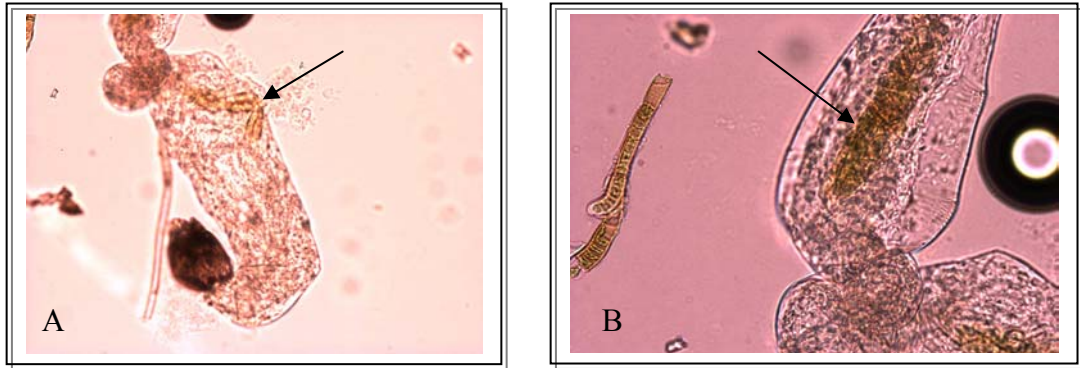


Figura 27. *Scytonema* en el tracto digestivo de un invertebrado. La figura A está tomada a 10X, la figura B es un acercamiento a 20X del tracto digestivo y un filamento de *Scytonema* al lado.

Después de 2 meses, se observó en el sustrato mixto una marcada diferencia entre los filamentos de *Scytonema* que se encontraban en la parte exterior de las colonias y las del interior. En láminas muy delgadas o en el exterior de las colonias, los filamentos mostraron una mayor cantidad de vainas dialinas y colapsadas, poca integridad celular y necridios (Fig. 28); en otros casos se observaron filamentos íntegros de color café en el exterior de las colonias (Fig. 29). En el interior de las colonias, aún después de 2 meses, los filamentos se mantuvieron mejor conservados, de color verde-azul, con yemas y heterocistos (Fig. 30). Aún así, no se observó crecimiento extendido de *Scytonema* en el sustrato.

Los tratamientos de sustrato mixto, presentaron varios talos de cianobacterias autóctonas (Fig. 31) que en algunos casos formaron costras o láminas delgadas que cubrieron gran parte de la maceta. Los talos de estas cianobacterias crecieron cuando el suelo se saturó de agua, sin embargo, en los riegos posteriores en donde se aplicó una menor cantidad de riego debido a problemas de sobresaturación de agua, los talos se volvieron dormantes.

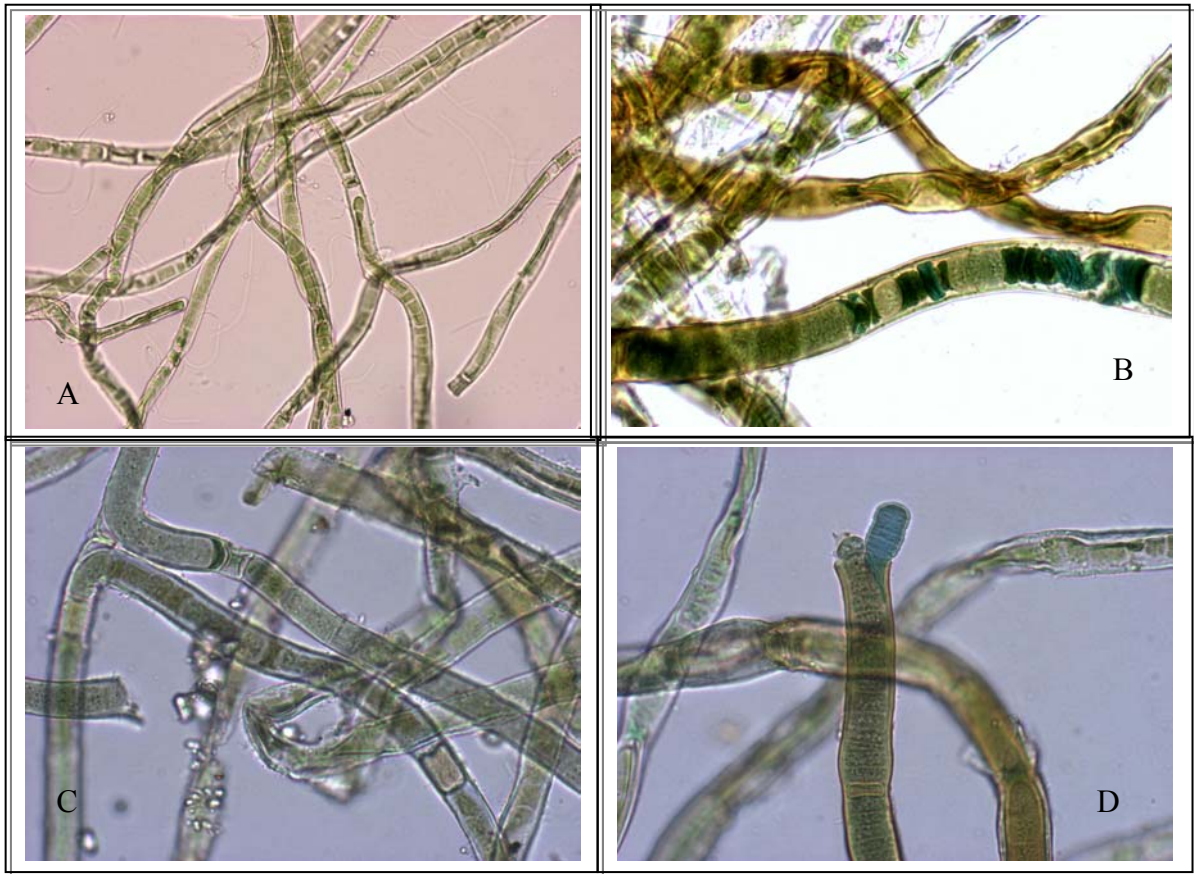


Figura 28. Filamentos del exterior de las colonias de *Scytonema ocellatum* después de 2 meses de ser inoculadas en suelo. La figura A fue tomada a 20X, las figuras B, C y D fueron tomadas a 40X.

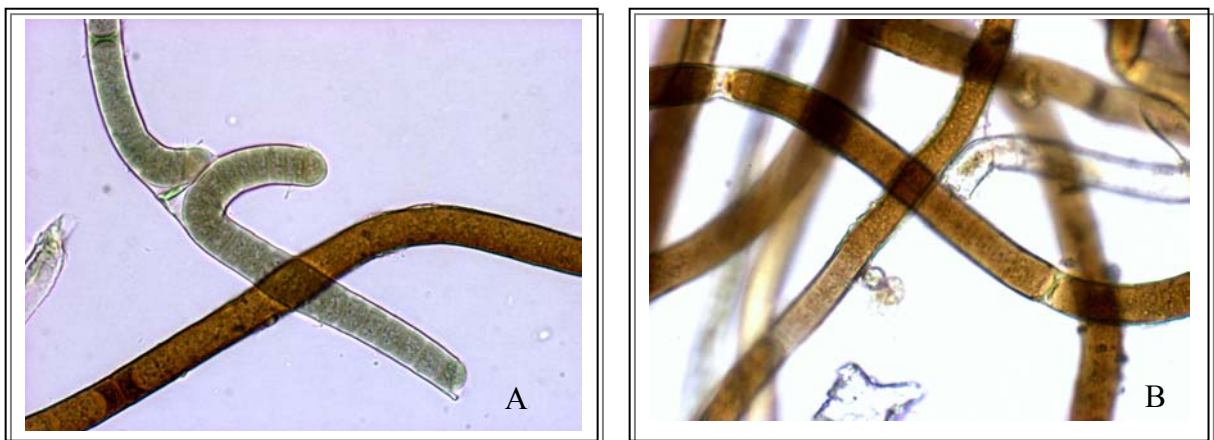


Figura 29. Filamentos del exterior de las colonias de *Scytonema ocellatum* en donde se muestra una pigmentación café. La figura A muestra la diferencia entre filamentos exterior e interior de una misma colonia. Escala 40X.

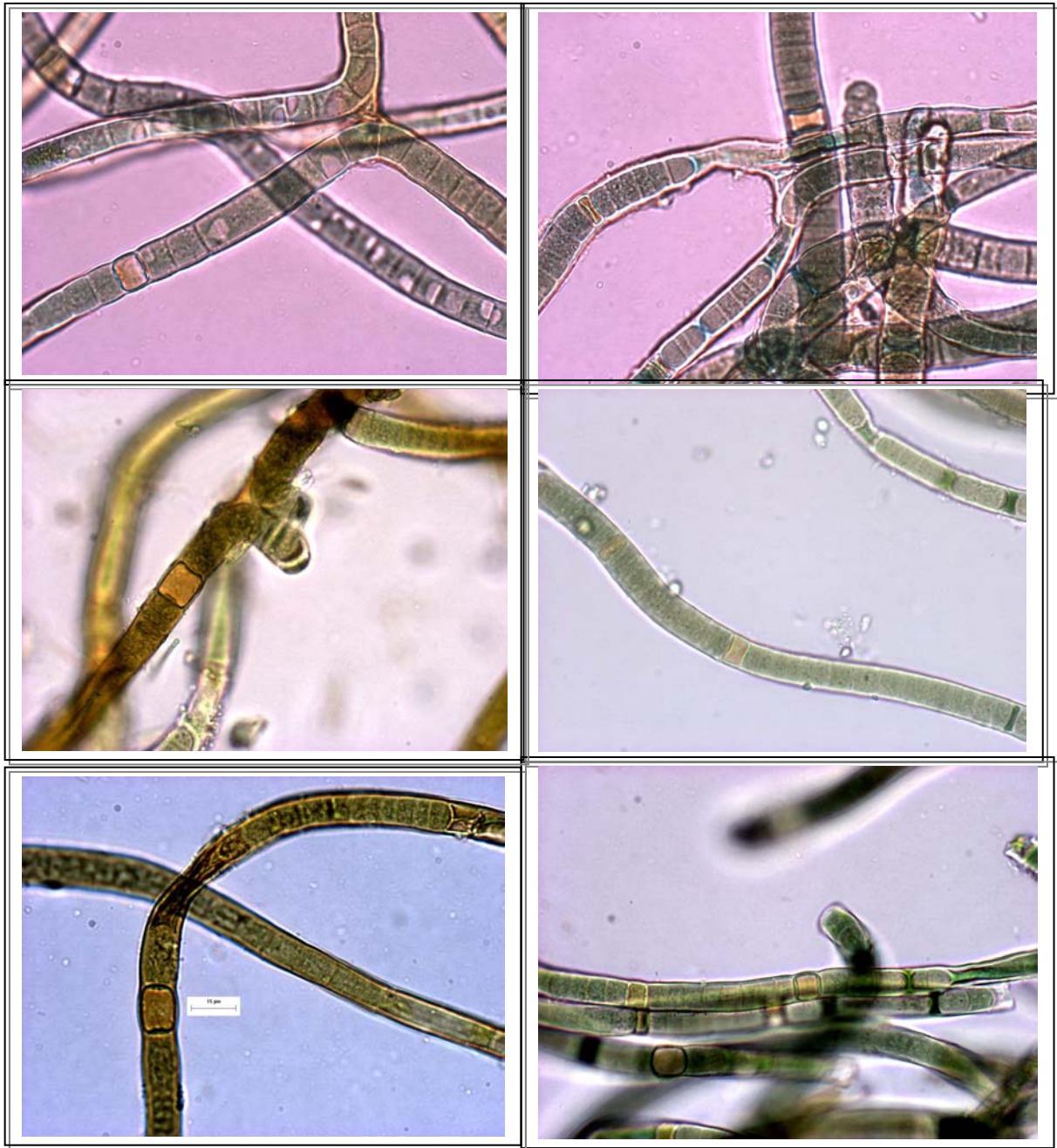


Figura 30. Filamentos del interior de las colonias de *Scytonema ocellatum*, en donde se muestran las células compartimentalizadas, con heterocistos, pigmentos verde-azul. Estas figuras fueron tomadas a 40X.

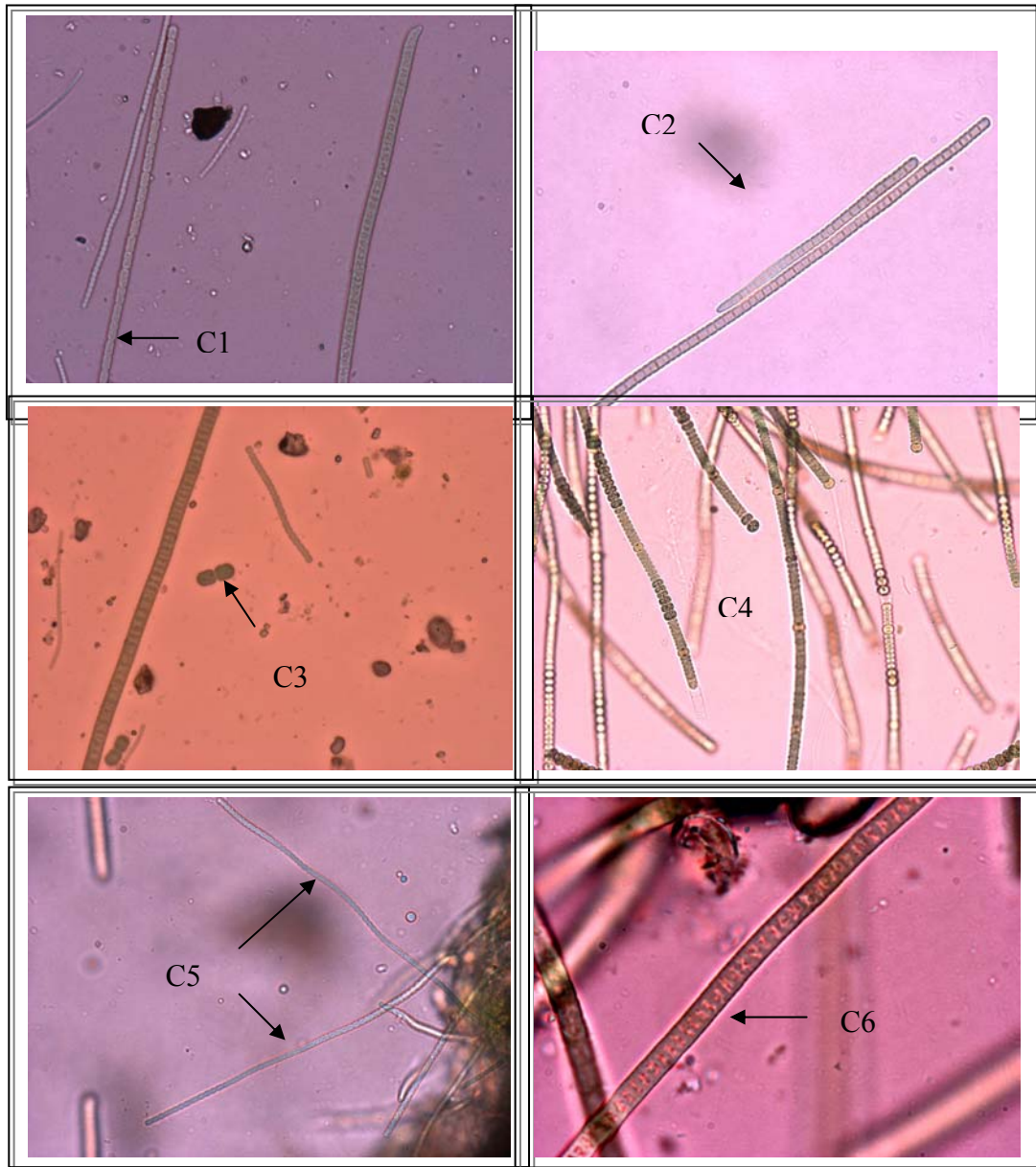


Figura 31. Comunidad de cianobacterias autóctonas del suelo del Campo Agrícola Experimental del CIBNOR, Comitán, BCS. C1 *Leptolyngbya* a; C2 *Microcoleus*; C3 *Synechococcus*; C4 *Nostoc*; C5 *Leptolyngbya* b; C6 *Geitlerinema*, asignación genérica de acuerdo a Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Segunda edición.

#### 7.4.2 *En campo*

Los filamentos de las colonias de *Scytonema* en campo, estuvieron bajo condiciones extremas de temperatura e intensidad de luz y presentaron una supervivencia diferencial entre el interior, exterior y periferia de las colonias. En el centro de las colonias se observó un color verde intenso, mientras que la capa externa presentó un color café y las orillas blanco-gris (Fig. 32).

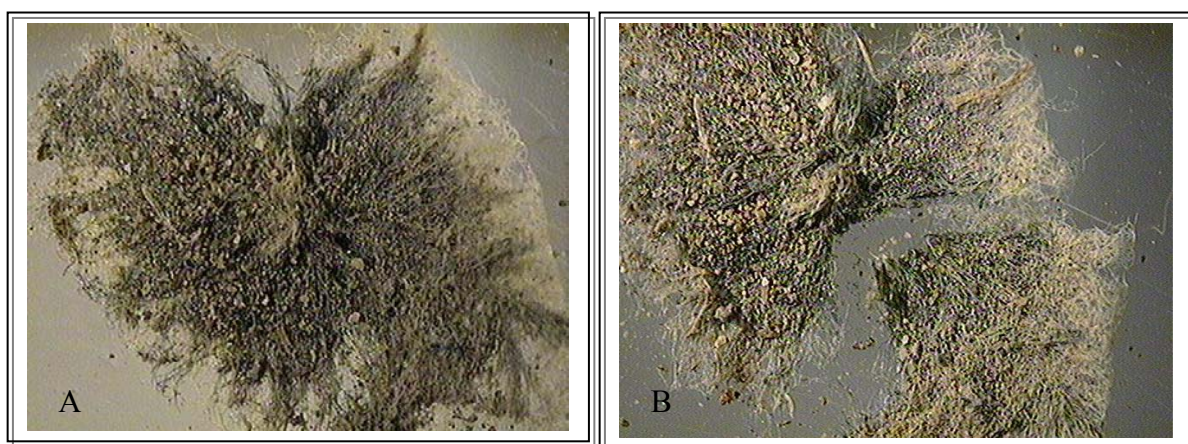


Figura 32. Micrografía de estereomicroscopio que muestra colonias de *Scytonema* inoculadas en campo. En A y B se observa que al centro de la colonia los filamentos son de color verde intenso y conforme la colonia se empieza a hacer más delgada, la coloración cambia a blanco.

#### 7.4.3 *Reactivación y almacenamiento*

Al finalizar los experimentos tanto en las macetas con chile como los del campo agrícola, se tomaron pedazos de lámina de *Scytonema* y se colocaron en medio Z8<sup>0</sup> líquido, sin agitación ni aireación. Después de 15 días aproximadamente, las láminas de *Scytonema* se reactivaron por completo y comenzaron a multiplicarse.

Para almacenar la biomasa de *Scytonema* obtenida en los biorreactores, se secó en forma de láminas (Figura 33) en horno a 40°C y se guardó en frascos de vidrio o en bolsas de plástico, dependiendo de la cantidad. Las láminas secas, se pudieron reactivar en medio Z8<sup>0</sup> al menos 6 meses después de haber sido guardadas en un lugar seco.



Figura 33. Lámina seca de *Scytonema ocellatum* de 4.54 gr



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Optimización de la producción de biomasa de *S. ocellatum*

#### 8.1.1 Medidas de crecimiento

##### *Correlaciones*

Marison (2000) reporta que la ventaja del método de volumen celular empaquetado (mediante centrifugación) para medir biomasa de microorganismos es la rapidez, pero que su mayor desventaja es la inexactitud. Sin embargo, para el caso específico de *Scytonema*, que tiene hábitos de crecimiento filamentoso y forma colonias esféricas de diámetro y peso variables (Fig. 34), la técnica modificada de volumen celular empaquetado resultó ser la más conveniente y la que mejor correlación tuvo con el peso seco. Por otro lado, varios métodos de medición de biomasa son destructivos, entre ellos el de clorofila, proteína y DNA (Marison, 2000). La ventaja de secar la biomasa a temperaturas no mayores a 45°C es que no afecta la sobrevivencia de *Scytonema*, por lo que se puede almacenar por largo tiempo y reactivarla de nuevo.

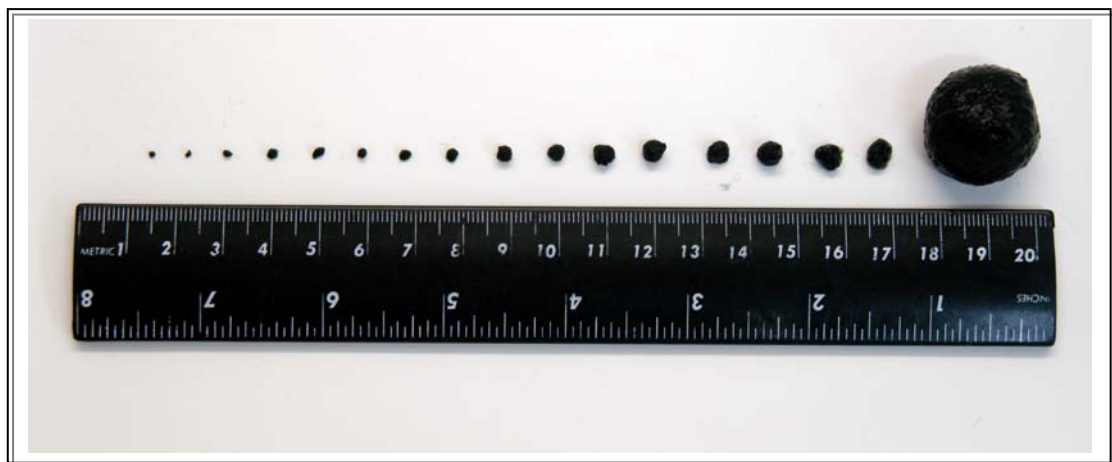


Figura 34. Tamaño de las colonias de *Scytonema ocellatum* bajo condiciones de aireación.

La correlación del diámetro de las colonias en relación con el peso seco presenta el inconveniente de que las colonias del mismo diámetro pueden tener diferente concentración de biomasa. Además, ésta característica dificulta la toma de muestras ya que las colonias más compactas y pesadas caen rápidamente al fondo, mientras que las más ligeras y esponjadas se mantienen en suspensión por más tiempo.

Fogg *et al.* (1973) mencionan que la intensidad de luz disminuye exponencialmente a través de sucesivas capas celulares en suspensión, y que continúa disminuyendo conforme la densidad del cultivo incrementa. De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que *S. ocellatum* forma colonias esféricas cuando se cultiva en agitación y aireación, se cree que la correlación baja entre la clorofila y el peso seco se debió al fenómeno de adaptación cromática (variación de la proporción de pigmentos fotosintéticos de acuerdo a la calidad e intensidad de la luz) porque los filamentos del exterior de las colonias les hacen sombra a los del interior. Posiblemente las células del interior de las colonias contienen una mayor proporción de ficofiliproteínas (que son pigmentos captadores de luz contenidos en los ficobilisomas) ya que el contenido celular de los ficobilisomas aumenta cuando la intensidad luminosa decrece (Madigan *et al.*, 2001), mientras que en el exterior de la colonia se encuentra una mayor cantidad de clorofila. Si la proporción de clorofila con respecto a otros pigmentos cambia a través de la colonia, no se recomienda la medición de clorofila como una medida de crecimiento de biomasa en los cultivos en donde *Scytonema* crece formando colonias esféricas.

### ***Diámetro de las colonias de *S. ocellatum****

Se observó que las colonias más abundantes fueron las de diámetro entre 1.0 y 2.0 mm, y que las colonias mayores a 4 mm de diámetro tienden a aumentar en volumen pero no en número. Esto sugiere lo siguiente: a) las colonias con diámetro entre 1 y 2 mm son las que se multiplican más rápido y/o, b) la velocidad de multiplicación es igual, pero es probable que las colonias pequeñas, a diferencia de las grandes, tengan más facilidad de formar otras colonias. Al reproducirse por fisión binaria el tricoma se fragmenta, cada fragmento puede formar un nuevo filamento y eventualmente una nueva colonia (Fay, 1983). El movimiento de las burbujas de aire en el medio de cultivo es una fuerza que puede ayudar a desprender filamentos de las colonias, sin embargo, entre mayor sea el diámetro de la colonia es más difícil desprender filamentos aún con una aireación fuerte. Se cree que los filamentos de las colonias mayores a 4 mm de diámetro, se encuentran muy enredados por el movimiento en los fotorreactores y adheridos entre sí por los exopolisacáridos de las vainas. Esto posiblemente funciona como trampa para la liberación de nuevos filamentos al medio. En cualquier caso, las colonias de diámetro entre 1.0 y 2.0 mm son de interés para el escalamiento del cultivo de *S. ocellatum*.

### ***8.1.2 Factores que afectan la velocidad de crecimiento***

#### ***Recambio del medio de cultivo***

Los principales factores que afectan la rapidez de crecimiento son la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH y la inhibición por producto (Marison, 2000; Vonshak, 1985). El cese del crecimiento es el resultado del agotamiento de un nutriente esencial o la acumulación de productos tóxicos (Marison, 2000). Por esto, se esperaba que a 70% de

recambio del medio de cultivo, la biomasa aumentara de manera significativa. Sin embargo, no hubo diferencias en la cantidad de biomasa ni en la velocidad de crecimiento de *S. ocellatum* entre recambios de 0%, 35% y 70%. Estos resultados sugieren un ahorro en los costos de producción ya que estadísticamente se produce la misma cantidad de biomasa con recambio del medio de cultivo, o sin él. No obstante, suponemos que el factor limitante no fue la disponibilidad de nutrientes, sino el intercambio gaseoso, que se discutirá más adelante, ya que se nota una clara tendencia a aumentar la velocidad de crecimiento y la biomasa en el tratamiento con 70% de recambio.

Por otra parte, el descenso en la biomasa que se presentó en el tratamiento de recambio del 35% al final de la curva de crecimiento (Figura 8b), posiblemente se debió a que la toma de muestras en un cultivo que no es homogéneo en el tamaño, número y peso de las colonias puede variar mucho entre una muestra y otra.

Se observó que la toma de muestras cada ocho días fue demasiado tiempo para cultivos en volúmenes menores a 2 litros. Se piensa que se perdieron puntos importantes en la curva de crecimiento (Fig. 8), especialmente antes y después del día 24.

Un inconveniente de este experimento fue que se utilizaron 3 réplicas en las cuales las desviaciones estándar fueron grandes y se traslaparon. Se recomienda en próximos experimentos utilizar un mínimo de 5 réplicas.

### ***Cultivo en sistemas de aireación***

Un método común de cultivo de microorganismos en el laboratorio, es la incubación en agitadores orbitales. La agitación orbital al igual que una aireación adecuada, mantiene el cultivo en una suspensión uniforme, previene la sedimentación de las cianobacterias y

permite la iluminación de la biomasa. Aunque la agitación es en general benéfica para el crecimiento de cianobacterias en cultivo, la respuesta a la intensidad de la agitación depende del microorganismo (Fogg *et al.*, 1973). Por ejemplo, *Anabaena cylindrica* crece bien en cultivos agitados a 90 rpm pero deja de crecer a 140 rpm, posiblemente debido a que los filamentos se dañan con el movimiento turbulento del medio de cultivo (Fogg y Than Tun, 1960 en Fogg *et al.*, 1973). A pesar de que Reyes Cota (no publicado) y López Cortés y Maya Delgado (2003) incubaron a *Scytonema ocellatum* en un agitador orbital a 500 rpm y 150 rpm, respectivamente, para generar el inóculo de biorreactores de 19 L, se observó en el presente trabajo que la incubación en agitador orbital a 200 rpm es bueno para mantener el cultivo pero no para crecerlo. Una alta tasa de crecimiento y buena cosecha de organismos aerobios fotótrofos depende de un adecuado suplemento de oxígeno y carbón disueltos en el medio (Anónimo 2, s/A; Vonshak, 1985). El oxígeno debe ser aportado continuamente ya que es sólo escasamente soluble en una solución acuosa (Cliffe, 2000). Durante la agitación orbital se lleva a cabo un intercambio gaseoso con el medio externo; sin embargo, se cree que el intercambio de gases no fue suficiente para generar una alta producción de biomasa a menos que se le aplique 70% de recambio del medio de cultivo, lo que aumentaría notablemente los costos de producción. Por lo tanto, el sistema de aireación es más eficiente que el de agitación orbital para la producción de biomasa de *Scytonema ocellatum*.

### ***Condiciones de incubación***

La temperatura juega un rol importante en el control de la productividad de los cultivos (Boussiba, 1993). Muchas cianobacterias no toleran temperaturas debajo de los 20°C y

crecen bien entre 20 y 30 °C (Rippka, 1988). Las cianobacterias de zonas cálidas se han cultivado en temperaturas entre 28 y 40 °C (López Cortés *et al.*, 2001b; López Cortés y Maya Delgado, 2003, Boussiba, 1993). De acuerdo a estos datos, se esperaba que la temperatura de 25 °C fuera más benéfica para el crecimiento de *S. ocellatum* que 20 °C y 23 °C; sin embargo, al incubarla a una temperatura de 23 °C con luz constante (24 horas), crecieron mejor que las que se encontraron en un régimen de luz de 12 horas a temperaturas de 20 y 25°C. Esto sugiere que la temperatura no fue el factor más determinante en la velocidad de crecimiento, sino el fotoperiodo.

Las cianobacterias normalmente se cultivan bajo regímenes de luz continua más que de ciclos de luz-oscuridad. Se han hecho investigaciones en las que se ha visto que este tratamiento no afecta al crecimiento (Rippka, 1988). Por otra parte, la luz puede funcionar como un promotor de la formación de heterocistos cuando las cianobacterias diazotrofas se incuban bajo condiciones fotosintéticas sin fuente de nitrógeno, ya que la relación de C:N en la célula incrementa gradualmente hasta llegar a la relación 8:1 en donde se dispara la actividad de la nitrogenasa (Fogg *et al.*, 1973). Reynaud y Roger (1979 en Fay, 1983) observaron que a 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  se daba la máxima actividad de nitrogenasa. Uno de los objetivos de este trabajo es producir biomasa de *Scytonema* promoviendo la fijación de nitrógeno, por lo que suponemos que esa intensidad de luz le favorece.

### ***Tiempos de incubación y tamaño del inóculo***

Como regla general, las cianobacterias tienen un crecimiento lento, de tal manera que es aceptable que la inoculación de matraces con un solo filamento o microcolonia tome de 2 a 3 meses para un crecimiento macroscópicamente visible (Rippka *et al.*, 1986). El tiempo

óptimo de incubación de un cultivo de microorganismos en sistemas cerrados está en función de la disponibilidad de nutrientes (Vonshak, 1985). Para el caso de *S. ocellatum*, los tiempos de incubación influyeron en la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa. En biorreactores menores a 500 mL el tiempo óptimo de cosecha se encuentra alrededor de los 26 días con un 10% de recambio, que podríamos considerarlo como un crecimiento rápido para los estándares de las cianobacterias según Rippka *et al.* (1986).

La relación inóculo/volumen del medio de cultivo también influyó en la velocidad de crecimiento poblacional de *S. ocellatum*. A pesar de que un inóculo pequeño crece más rápido posiblemente porque tiene mayor disponibilidad de nutrientes y mayor disponibilidad de luz, para obtener una alta productividad en biomasa es necesario mantener altas concentraciones de la misma (Lee, 2001). Un inóculo grande disminuye la fase de adaptación en la curva del crecimiento para llegar rápidamente a la fase exponencial y luego a la fase estacionaria, se puede mantener en ese estado durante largo tiempo en fotorreactores cerrados si cada determinado tiempo se extrae parte de la biomasa que creció (Boussiba, 1993).

El tamaño óptimo de la concentración celular depende de la especie, del grado de turbulencia inducida y otras limitaciones ambientales (Vonshak, 1985). Allen y Arnon (1955a en Fogg *et al.*, 1973) reportaron que en cultivos de *Anabaena cilíndrica* se pueden obtener de 7 a 8 g de peso seco por litro de medio de cultivo, mientras que en un biorreactor de 1 L se logró llegar a la concentración máxima de 3.8 g peso seco de *Scytonema ocellatum*. Esta concentración de biomasa de *S. ocellatum* quizá puede aumentar al incubarla en biorreactores de mayor capacidad volumétrica y 24 horas luz ya que quizá

los factores limitantes para una concentración mayor de biomasa fueron el volumen recipiente y la fijación de carbón por fotosíntesis.

### ***8.1.3 Escalamiento***

Una regla general que se aplica a menudo en el escalamiento de los cultivos es la similitud geométrica entre los recipientes pequeños y grandes. Sin embargo, los parámetros pertinentes que afectan el mezclado (flujo de gas constante/unidad de volumen y tiempo de mezclado) pueden variar ampliamente entre escalas (Cliffe, 2000). En el caso del escalamiento de este trabajo se procuró mantener el mismo flujo de aire, guardar la similitud geométrica y el tipo de material entre los biorreactores. Sin embargo, el tiempo de mezclado en los recipientes de 2 L fue menor que en los de 19 L y esto pudo haber influenciado el aumento en el tiempo de generación y la disminución en la velocidad de crecimiento. Por ello, se cree que a medida que se aumenta la capacidad del biorreactor habrá que incrementar también la aireación para fomentar un menor tiempo de mezclado y obtener los mismos rendimientos de producción de biomasa que en los volúmenes menores.

### ***Cinética de crecimiento en garrafones de 19 L***

Las desviaciones estándar de los puntos de la cinética de crecimiento fueron grandes debido a errores de muestreo. La obtención de una muestra representativa en garrafón depende de una buena aireación, del peso de las colonias y de la rapidez de extracción. Si la aireación mantiene las colonias en suspensión homogénea pero la extracción es lenta, las colonias tienden a caer; entre más compactas y pesadas sean las colonias, caerán más rápido y se extraerá una muestra mayor. Esto último fue lo que pasó en el garrafón B (Fig. 12).



La cinética de crecimiento de *S. ocellatum* obtenida por Reyes Cota (no publicado), incubada en medio de cultivo Z8<sup>0</sup>, a 28 °C e intensidad de luz de 50  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  en garrafones de 19 L, muestra que la *Scytonema* seguía creciendo después de 50 días de incubación. En contraste, los garrafones de 19 L del presente proyecto, incubados en Z8<sup>0</sup>, 26 °C, 24 horas luz, 30  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , llegaron a la fase estacionaria a los 18 días. Vonshak (1985) menciona que para una rápida multiplicación de microalgas, se incuban a 100  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  en medio líquido y una vez obtenido un buen crecimiento (después de 1 o 2 semanas) se transfieren a menor iluminación (10-20  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para mantenerlas creciendo lentamente. Quizá la cantidad de luz fue limitada para el crecimiento para *S. ocellautm*, aún cuando la exposición fue de 24 horas.

Otra posible explicación a la diferencia de las cinéticas, es que Reyes Cota extrajo biomasa cada 10 días en vez de cada tercer día. Se cree que la muestra que se extrajo cada tercer día era la biomasa de *Scytonema* que se había multiplicado, logrando de esta manera, mantener en promedio una densidad celular de 130 mg/L en cada garrafón y haciendo parecer una fase estacionaria.

Por otra parte, el medio Z8<sup>0</sup> que se empleó en este proyecto contenía fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en lugar de dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Estos dos compuestos combinados son empleados como agentes buffer. El dibásico es un ingrediente de fertilizantes instantáneos (Manual Merck Index). Se sabe que el pH afecta el crecimiento de los microorganismos (Marison, 2000) por lo que se midió el pH al medio Z8<sup>0</sup> con fosfato monobásico y con dibásico y ambos resultaron neutros, 7.21 y 7.47 respectivamente. Fogg *et al.* (1973) mencionan que la mayoría de las cianobacterias crecen bien en un rango de pH entre 7.0 y 8.5. Por esto se piensa que si hubo algún efecto en el crecimiento de los cultivos

debido a este cambio de compuestos, posiblemente no se debió al pH sino a la disponibilidad de potasio en el medio ya que la concentración de este elemento en la fórmula original de Z8 es de 0.139 mg/L de medio de cultivo, mientras que utilizando fosfato de potasio monobásico la concentración se redujo a 0.0889 mg/L de medio de cultivo.

Una parte importante del escalamiento de biomasa de microorganismos, es la reducción del costo de producción. El crecimiento de una alga y cianobacteria es altamente dependiente de la disponibilidad de nitrógeno, ya que entre 7 y 9 % de su peso seco es nitrógeno. Para producir 1.0 g de células en 1 litro de cultivo se requiere un mínimo de 500-600 mgL<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> (para microalgas) (Vonshak, 1985). Por esta razón se esperaba que los cultivos de *Scytonema* que contenían medio de cultivo con fuentes de NO<sub>3</sub>, crecieran a mayor velocidad, y por consiguiente se obtuviera mayor biomasa que los cultivos incubados sin este compuesto. Sin embargo, no se presentó una diferencia estadística pero sí una tendencia a favor de los medios con fuente de nitrógeno. Quizá este resultado se deba a que, como se mostró en la Figura 10, después de los 26 días de incubación los cultivos disminuyen su velocidad de crecimiento y estos biorreactores se mantuvieron durante 49 días. Por otro lado se reporta que los organismos diazotrofos no fijan N<sub>2</sub> a menos que sea necesario, debido al enorme gasto energético que ello significa (Beltrán Morales, 2003). Pero si a la *Scytonema* le hubiera sido ventajoso tomar el nitrógeno de los compuestos del medio, habría aumentado en gran medida el tamaño de población en la fase exponencial. No obstante, la cantidad de biomasa final de los biorreactores con medios de cultivo con nitrógeno (Z8 y Z8<sup>1/2</sup>) fue 9 % mayor que los que no tenían (Z8<sup>0</sup>), y sin embargo, el costo económico del medio de cultivo con nitrógeno (Z8) es 37% mayor que el que no tiene

(Z8<sup>0</sup>). Debido a la diferencia entre la biomasa final comparada con el costo de producción, el medio de cultivo sin fuente de nitrógeno (Z8<sup>0</sup>) es un buen candidato para la producción masiva de *Scytonema ocellatum*.

## 8.2. Retención de Humedad

### 8.2.1 Retención de agua y partículas de suelo de *Scytonema ocellatum*

Wang *et al.* (1981 citado en Verrecchia, *et al.*, 1995) mencionan que las cortezas microbióticas (compuestas por líquenes, hongos y cianobacterias entre otros microorganismos) absorben más de 8 veces su peso en agua en periodos menores a 30 segundos en tanto que *Scytonema* sola absorbió 5.6 veces su peso en agua. La irregularidad de la superficie de las cortezas aumenta la capacidad de infiltración del agua y reduce la escorrentía (Lope y Gifford, 1972 en St. Clair *et al.*, 1984).

Se observó que las láminas de *Scytonema* retuvieron una cantidad importante de partículas de suelo, especialmente en la superficie, aunque lo anterior no fue evaluado cuantitativamente. Tal efecto concuerda con lo reportado en la literatura en donde las cortezas microbióticas retienen fracciones de arcilla y limo que se pegan al material mucilaginoso de las vainas, especialmente cuando están mojadas (Belnap y Gardner, 1993; Maya *et al.*, 2002; Verrecchia *et al.*, 1995).

### 8.2.2 Retención de humedad en suelo contenido en macetas

La capacidad de agua aprovechable en el suelo de textura franco arenoso es entre 3.4% (punto de marchitamiento) y 11.3% (capacidad de campo) teniendo el óptimo de capacidad de agua aprovechable en un 7.9% de humedad en el suelo (Ortiz Villanueva y Ortiz

Solorio, 1990). Para el día 12, el porcentaje de humedad del tratamiento control (9.89%) y el de baja concentración de *Scytonema* (11.33%) estaban dentro del intervalo de agua aprovechable, mientras que los tratamientos de media y alta concentración de *Scytonema* se mantuvieron ligeramente arriba del 12% de humedad. El día 15, el porcentaje de humedad siguió disminuyendo y los tratamientos control, concentración baja y media de *Scytonema* se encontraron entre 6% y 7%, mientras que en las macetas con concentración alta tuvieron un promedio de 8% de humedad. Es necesario realizar estudios más detallados al respecto, en virtud de la importancia de evaluar la retención de humedad por más de 15 días, hasta llegar a las condiciones de sequía características del punto de marchitamiento permanente. Para un experimento de continuación sería recomendable incrementar la población de *Scytonema* en el suelo, ya sea en macetas o en parcelas, para observar un contraste mayor entre los porcentajes de retención de humedad. Cabe aclarar que el experimento se realizó en diciembre, con porcentajes de humedad entre 68% y 92%, por lo que posiblemente el incremento de porcentaje de humedad del día 3 se debió a que los filamentos absorbieron el rocío.

De acuerdo a lo que reportan Verrecchia *et al.* (1995), las cortezas microbióticas sellan la superficie del suelo y limitan la pérdida de agua por evaporación, y los exopolisacáridos de las cianobacterias absorben la porción de agua que sube por la capilaridad del suelo y que estaba destinada a la evaporación.

La mayoría de los experimentos para demostrar la capacidad de las cianobacterias de las cortezas microbióticas para retener humedad en el suelo, se han hecho con cortezas naturales (Belnap y Gardner, 1993; Verrecchia *et al.*, 1995). Este trabajo reporta que un

cultivo monoalgal de *Scytonema* tiene la capacidad de retener hasta 1.3 veces más humedad en el suelo que el control.

Estos resultados preliminares sugieren que la cobertura del suelo con *Scytonema* podría disminuir la frecuencia de riego en cultivos agrícolas. Sin embargo, se debe probar la capacidad de *Scytonema* en la retención de humedad en macetas con plantas, ya que la evapotranspiración de las plantas cede a la atmósfera entre 95 y 98% del agua que toma del suelo (Kramer, 1989).

### **8.2.3 Retención de humedad en suelo de campo agrícola**

En la literatura se reporta que un suelo de textura franco arenosa tarda 2 días para alcanzar la capacidad de campo después de saturarlo con agua, posteriormente se mantiene por lo menos 6 días en capacidad de campo (Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990) obteniéndose una curva como las de la Figura 17. El porcentaje de agua aprovechable para las plantas, se encuentra entre la capacidad de campo y el punto de marchitamiento, y es la humedad en la que estamos interesados.

El contenido de humedad de agua en el suelo está fuertemente influenciado por la interacción de condiciones edafológicas y ambientales, tales como la textura y la estructura, propiedades del suelo, así como la temperatura, humedad ambiental, radiación y tasa de evaporación, principalmente. Es claro que el suelo drenará más rápido a altas temperaturas y condiciones de sequía cuando los resultados de la acción del agua disminuyan. El efecto de la temperatura en el grado de humedad ha sido considerada en relación a los datos de número de nubes y días soleados en la región, lo cual provee información de la génesis y el estado de transición del agua líquida al estado gaseoso (evaporación) (Tomašić, 1996). Para

el caso de El Centenario, B.C.S., en el mes de junio del 2003, las condiciones de temperatura a medio día fueron entre 36 y 40 °C y entre 54 y 64 % de humedad relativa, sin nubes, que según Palmer y Friedmann (1990) no son condiciones óptimas para la reactivación de las cianobacterias. Suponemos que esa fue la razón para no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos de cobertura orgánica (mantillo de frijol gandul, concentración media y alta de *Scytonema*) y el control, a pesar de que se utilizó más biomasa de cianobacterias que el experimento en las macetas para cubrir el suelo. Por esta razón se recomienda hacer un nuevo experimento en otoño, invierno y primavera, cuando las condiciones climáticas son menos extremosas.

#### **8.2.4 Contenido de amonio y nitrato en el suelo**

Estudios previos han demostrado que *Scytonema* fija nitrógeno molecular y que libera extracelularmente compuestos nitrogenados (Belnap, 2001; Maya *et al.*, 2002). La liberación de compuestos nitrogenados es mayor durante el periodo de humedad después de la desecación (Jeanfils y Tack, 1992 en Belnap, 2001). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con cobertura de *Scytonema*, con el mantillo y el control. Se cree que esto se debe a las condiciones de estrés a las que se sometieron al llevarlas del cultivo líquido en condiciones controladas a condiciones secas del campo de cultivo en verano, lo que inhibió la actividad de fijación y liberación de nitrógeno.

#### **8.2.5 Temperatura en el suelo**

Una corteza microbiótica bien desarrollada y estructurada es más oscura que un área que no tiene corteza. Como resultado del color, la temperatura superficial del suelo puede ser

mayor (Belnap *et al.*, 2001b), y las reacciones químicas y las tasas metabólicas asociadas a organismos puede ser más rápidas a finales del otoño, invierno y a principios de primavera, cuando exista la humedad suficiente y disponible. Las temperaturas calientes del suelo pueden resultar en un incremento de captación de minerales esenciales del suelo, ya que incrementando la temperatura se incrementa la tasa metabólica y la captación de minerales, por lo que la temperatura del suelo es un factor importante para el buen desarrollo de las raíces de las plantas (Salisbury y Ross, 1985).

### **8.3 Valoración Agrobiológica de *Scytonema* en Plantas de Chile**

#### ***8.3.1 Contenido de clorofila total***

Aunque no se presentaron diferencias significativas de contenido de clorofila total entre los tratamientos de aplicación de *Scytonema*, se observó que el empleo de fertilizante favoreció un mayor contenido de clorofila total, tanto en sustrato Sunshine como Mixto. El fertilizante Hoagland contiene magnesio (Anexo IV) que es un componente primordial de la molécula de clorofila (Fogg *et al.*, 1973). El tratamiento de sustrato Sunshine con agua fue el tercero con mayor contenido de clorofila posiblemente favorecido por los nutrientes que contiene, mientras que el sustrato mixto con agua presentó los valores más bajos de este pigmento.

#### ***8.3.2 Contenido de proteína en frutos de Chile***

En este trabajo el término “proteína” es en realidad el contenido de nitrógeno total de la muestra multiplicado por el factor 6.25 (de acuerdo al método Kjeldhal) que puede

sobreestimar el contenido real de proteína ya que el método cuantifica también otros compuestos como aminos, ácidos nucleicos, alcaloides (en el caso del chile la capsicina), etc.

Los resultados de contenido de proteína en frutos de chile, sugieren que *Scytonema ocellatum* ejercen una influencia significativa sobre los compuestos nitrogenados con respecto al control, sobre todo cuando se aplica en etapa de plántula, teniendo una influencia más fuerte en el sustrato mixto y en el riego con agua.

En estudios previos se ha observado que los organismos diazotrofos evitan fijar nitrógeno si pueden asimilar compuestos nitrogenados con un menor gasto de energía (Fogg *et al.*, 1973; Baca *et al.*, 2000 en Beltrán Morales, 2003); en este contexto, al parecer cuando se inoculó *Scytonema* en los sustratos *SunFert*, *SunAgua* y *MixFert*, esta cianobacteria pudo asimilar compuestos nitrogenados del medio. Sin embargo, puede inferirse que en el sustrato *MixAgua*, esta cianobacteria tuvo que fijar nitrógeno que posteriormente se liberó al medio en forma de compuestos nitrogenados, y en virtud de que el sustrato mixto retiene el agua más fácilmente que el Sunshine, las plantas pudieron absorber mejor los nutrimentos.

De acuerdo a Kulasooriya *et al.* (1972 en Fogg *et al.*, 1973) en *Anabaena cilíndrica* una relación alta de carbono con respecto a nitrógeno (8:1) induce la fijación de nitrógeno. De acuerdo a lo anterior, se esperaría que en el sustrato Sunshine que contiene 83.22% de materia orgánica, *Scytonema* fijara y liberara una mayor cantidad de nitrógeno que se podría traducir en proteína del chile. Sin embargo, los valores más altos de proteína se presentaron en el sustrato mixto. Este resultado posiblemente se debe a: 1) en el sustrato Sunshine (con 83.22% de materia orgánica) *Scytonema* fijó nitrógeno en grandes cantidades



pero debido a la porosidad y buen drenaje del sustrato, los compuestos nitrogenados se lixiviaron, o 2) el sustrato Sunshine y el riego con fertilizante contienen fuentes de nitrógeno que son fácilmente asimilables para *Scytonema*, por lo que la actividad de fijación de nitrógeno no fue muy abundante.

Tanto el sustrato Sunshine como el mixto regados con fertilizante resultaron en valores menores de porcentaje de proteína que los regados con agua. Estos resultados concuerdan con la teoría descrita anteriormente que señala que cuando hay compuestos nitrogenados en el medio que son energéticamente menos costosos, las cianobacterias los asimilan.

A pesar de que el promedio de porcentaje de materia orgánica del sustrato mixto es de 2.55 %, la ventaja de *Scytonema ocellatum* como biofertilizante en suelos pobres en materia orgánica y nitrógeno disponibles es que ella por sí misma es una fuente de carbono. Si está viva, mediante fotosíntesis fija carbón, cuando alcanza el balance C:N necesario para disparar la actividad de la nitrogenasa (Nasa) fija nitrógeno que eventualmente liberará al medio en forma de nitrógeno reducido. En lo que respecta a este punto, habrá que hacer un estudio específico de *Scytoenma* para saber hasta que balance de C:N se dispara la actividad de la Nasa.

Más del 90% de todos los fertilizantes nitrogenados consideran el amoníaco como materia prima (Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990), y aproximadamente el 50% de los abonos nitrogenados que se emplean en los cultivos es aprovechado por las plantas, el resto se pierde. La solución a estas pérdidas se encuentra en el aporte de menores cantidades de fertilizante con mayor frecuencia o el empleo de abonos de lenta liberación que aporten

compuestos nitrogenados progresivamente (Beltrán Morales, 2003). Se sugiere que *Scytonema* se puede aplicar a un cultivo en etapa de plántula continuando la adición de esta cianobacteria a lo largo de su ciclo de producción, ya que se puede visualizar como un biofertilizante de lenta liberación que permanece vivo en el suelo y va liberando compuestos nitrogenados al medio poco a poco.

### **8.3.3 Frutos de chile**

El agua es un componente determinante y esencial en lo que a las plantas se refiere ya que constituye de un 80 a un 90% del protoplasma de las células de las plantas herbáceas y un 50% de las leñosas. El agua mantiene la forma relativamente rígida de las plantas a través de la turgencia que provoca el ensanchamiento de las células (Kramer, 1989). De acuerdo con lo anterior, se observó que los frutos más largos y pesados se presentaron en el sustrato Sunshine. Posiblemente las plantas se beneficiaron por el buen drenaje y la porosidad de este sustrato que permitió la absorción de agua y la respiración adecuada de las raíces (Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990), en comparación con los frutos más pequeños de las plantas del sustrato mixto, que se anegaron en la etapa de plántula.

A consecuencia del estrés hídrico, la tasa de división celular y la tasa de elongación de los ápices se ven reducidos, de este modo el crecimiento de la planta (y por ende de los frutos) puede detenerse aún cuando la intensidad sea tolerable y la duración del déficit sea de unas pocas horas. La etapa de crecimiento en el cual ocurre el estrés hídrico puede influir de una manera importante la producción final de los cultivos (Slatyer, 1967) y, si el daño no fue muy severo, el efecto de la insuficiencia de agua puede mitigarse con la aplicación de fertilizantes químicos (Ortiz Villanueva y Ortiz Solorio, 1990), como fue el caso de los

frutos en sustrato *MixFert* que fueron significativamente más grandes y pesados que los de *MixAgua*, a pesar de que ambos tratamientos se anegaron en etapa de plántula.

#### **8.3.4 Contenido de amonio en suelo contenido en macetas**

A pesar de que no se presentaron diferencias significativas en el contenido de amonio en el suelo de las macetas al igual que el trabajo de López Cortés y Maya Delgado (2003), se observa una tendencia a una mayor cantidad de amonio en la superficie del suelo (*MixFert*) en los tratamientos con *Scytonema*. Según (Harper y Pendleton, 1993) las cianobacterias en la superficie del suelo pueden competir vigorosamente con las plantas vasculares por los minerales cuando las condiciones para el crecimiento de las cianobacterias es buena, por lo que el aumento en el contenido de amonio en la superficie del sustrato puede ser una consecuencia del aprovechamiento de los nutrientes del fertilizante.

### **8.4 Supervivencia, Integridad y Reactivación de *Scytonema ocellatum***

#### **8.4.1 En cultivo de chiles en suelo contenido en macetas**

En el sustrato Sunshine, fue difícil monitorear la supervivencia de *Scytonema* debido a que el sustrato las cubría cuando se regaba la maceta y a los pocos días ya no se podían encontrar. Por otro lado, suponemos que la comunidad de invertebrados y microorganismos influyó desfavorablemente en la permanencia de esta cianobacteria.

En el sustrato Mixto, se observó una supervivencia diferencial en las colonias, presentando filamentos dialinos y colapsados en la periferia de las colonias o bien filamentos pigmentados de color amarillo-café, mientras que en el interior de las colonias se encontraron filamentos íntegros, verdes, con yemas y heterocistos.

#### 8.4.2 *En campo*

Desde hace tiempo se ha estado trabajando en el problema de la supervivencia y establecimiento de los inóculos de cianobacterias en suelos de zonas áridas y en cultivos (principalmente arroz) . Se ha visto que la permanencia de las cianobacterias en cultivo de arroz no ha sido mucho problema ya que están en condiciones de humedad abundante y es una práctica milenaria. El problema ha surgido cuando se ha intentado establecer colonias de cianobacterias en el suelo, principalmente para fines de restauración (Buttars *et al.*, 1998; Kubeckova *et al.*, in press; Riley y Johansen, 2001). La retención de agua es un factor limitante para el metabolismo de las cianobacterias silvestres que crecieron expuestas a sequía e irradiación solar directa, las cuales requieren 20 minutos en condiciones de humedad para reactivarse (García-Pichel y Pringault, 2001; Jefries *et al.*, 1992; Verrecchia *et al.*, 1995). En cambio, para las cianobacterias cultivadas en medio líquido y condiciones controladas de laboratorio, el problema de la falta de agua, la incidencia solar y la temperatura las afecta y las somete a una condición de estrés, como el caso de *Scytonema* que se aplicó directamente del medio de cultivo (condiciones líquidas,  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $30 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) al suelo en campo.

Se ha registrado que la abundancia de cianobacterias disminuye en el verano posiblemente a las altas temperaturas del suelo mayores a  $40^\circ\text{C}$  que son condiciones por encima de lo óptimo para la actividad fotosintética de las cianobacterias, y a sucesivos periodos cortos de hidratación que no permiten una ganancia neta de carbón y puede inducir a la mortalidad (Bowker *et al.*, 2002; García Pichel y Belnap, 1996; Johansen y Rushforth, 1985). La radiación solar induce daños al PSII y blanquea los pigmentos fotosintéticos pudiendo resultar en una disminución de la tasa de fotosíntesis e incluso en muerte (Bowker *et al.*,

2002). Las experiencias de este trabajo sugieren que no es muy conveniente aplicar *Scytonema* directamente del matraz al campo porque es una condición estresante para la cianobacteria. Lo anterior pudo haber modificado los resultados que se esperaban en el contenido de amonio en el suelo; en este sentido se infiere que las cianobacterias en lugar de enfocar su energía a fijar nitrógeno, alternativamente la enfocaron a protegerse de las condiciones adversas, produciendo pigmentos protectores de radiación UV como la scytonemina (Bowker *et al.*, 2002). Se recomienda para un próximo experimento utilizar cianobacterias previamente secadas en horno a 40 °C para someterlas a una condición de estrés hídrico y térmico y mantenerlas en una condición dormante. Bajo esta condición, teóricamente cuando se coloquen los inóculos en el suelo y reciban agua, deberán de responder en las próximas horas fijando C y N (García-Pichel y Pringault, 2001; Jefries *et al.*, 1992; Verrecchia *et al.*, 1995).

#### **8.4.3 Reactivación y almacenamiento**

Algunos de los problemas de la inoculación de cianobacterias o cortezas microbióticas en suelo es la sobrevivencia, la reactivación y el almacenamiento. Se han hecho trabajos de restauración de suelos con cianobacterias en estado dormante en donde utilizan pellets o trozos de tela de yute como vehículo (Buttars *et al.*, 1998; Kubeckova *et al.*, in press; Riley y Johansen, 2001). En este trabajo, se propone la aplicación directa de la cianobacteria *Scytonema ocellatum* en forma de láminas u obleas secas (Fig. 33) que suponemos se pueden almacenar por largos periodos de tiempo, esta forma no requiere de un proceso de pelletizado ni de adhesión de los filamentos a pedazos de tela.

## 9. CONCLUSIONES

### 9.1. Optimización de la producción de biomasa de *Scytonema ocellatum*

La técnica modificada de Volumen Celular Empaquetado utilizada en la medición del crecimiento poblacional mostró resultados favorables al correlacionarlos con el peso seco ( $R^2=0.9$ ). Este procedimiento no destruye la muestra, es rápido, confiable y no presenta el inconveniente de la adaptación cromática ni el de sobre o subestimar el peso de las colonias por su diámetro.

El tamaño de las colonias que se debe usar preferentemente para el escalamiento de la producción de biomasa de *S. ocellatum*, es entre 1-2 mm debido a que se ha observado que este tamaño de colonias se reproduce más rápido.

El uso de la aireación disminuye los costos de producción de biomasa al disminuir la cantidad de recambio del medio de cultivo.

Los factores que incrementan la velocidad de crecimiento de *Scytonema* son: temperaturas mayores a 20°C, 24 horas luz, aireación constante, intensidad de luz entre 100 y 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  para envases de vidrio transparentes y 500  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  para garrafones de plástico azul transparente.

La máxima velocidad de crecimiento se alcanza alrededor de los 26 días cuando se hace recambio del 10% del medio de cultivo, por lo que la cosecha o el escalamiento deben hacerse en esos días.

La producción de biomasa empleando medio de cultivo con fuente de nitrógeno (Z8) y medio sin fuente de nitrógeno (Z8<sup>0</sup>) no presentó diferencias significativas. Esto implica un

ahorro del 37.7% en los costos del medio de cultivo, y por lo tanto en los costos de producción.

### **9.2 Retención de Humedad en el Suelo**

*Scytonema ocellatum* absorbe y retiene un mayor porcentaje de humedad en el suelo que el control, del 13.32% al 21.82% entre el noveno y quinceavo día cuando las condiciones de temperatura fueron menores de 30 °C y las humedades relativas mayores a 60 %. Este aumento en el contenido del agua aprovechable del suelo puede significar un ahorro en el gasto de los agricultores de invernadero al poder espaciar los riegos.

Por otro lado, el color oscuro de *Scytonema* puede aumentar la temperatura del suelo e incrementar la tasa metabólica de otros microorganismos que hacen aportaciones importantes de minerales que las plantas aprovechan.

### **9.3 Valoración Agrobiológica de *S. ocellatum* en Plantas de Chile**

Tanto la clorofila en hojas, como el peso y talla de los frutos de chile, el tratamiento que obtuvo los valores más altos fue en el que se empleó sustrato 100% orgánico y fertilizante, independientemente de si se inoculó con *S. ocellatum* o no. Sin embargo, el tratamiento en donde se presentaron los valores más altos de proteína en frutos fue en el que se empleó sustrato mixto (30% sustrato orgánico + 70% suelo), regado con agua y con aplicación de inóculos de *S. ocellatum* en etapa de plántula, que es la etapa más crítica de la planta. Por lo anteriormente expuesto, se propone el empleo de inóculos de *S. ocellatum* como un

biofertilizante de lenta liberación que mejora la calidad en términos de proteínas, de los frutos de Chile.

#### **9.4 Sobrevivencia, Integridad y Reactivación de *Scytonema ocellatum* en el Suelo**

Por su característica de organismo pionero, *Scytonema* tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes extremos de temperatura y sequía. Para los fines de este proyecto, se corroboró la capacidad de *Scytonema* para permanecer viva y viable en el suelo, bajo las condiciones ambientales del sitio experimental, en Comitán, B.C.S. Lo anterior nos permite incrementar las expectativas de *S. ocellatum* como un biofertilizante capaz de ser aprovechado por el sector agropecuario de zonas semiáridas.

La sobrevivencia de *S. ocellatum* en el suelo fue diferencial dentro de la colonia, los filamentos de la capa externa y de la periferia de las colonias pueden presentar cambios en la coloración, posiblemente por la producción de pigmentos como la scytonemina que son protectores contra la radiación UV, o pueden colapsarse y morir. Los filamentos internos de la colonia permanecen vivos e íntegros durante 2 meses por lo menos.

Las láminas de *S. ocellatum* que han estado expuestas a temperaturas entre 40 y 60 °C y secas, se pueden guardar por lo menos 2 meses y reactivar completamente aproximadamente en 20 días en medio líquido Z8<sup>0</sup>.



## 10. BIBLIOGRAFÍA CITADA

**Alexander, M.** 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor. México.

**Anónimo 1.** 2003. [www.chemical-engineering-design.com/projects/coconut.pdf](http://www.chemical-engineering-design.com/projects/coconut.pdf)

**Aranibar, J.N., Anderson, I.C., Ringrose, S. y Macko, S.A.** 2003. Importance of nitrogen fixation in soil crusts of southern African arid ecosystems: acetylene reduction and stable isotope studies. *J. Arid Environ.*, 54:345-358

**ASERCA.** Reporte de precios diarios de chiles secos en 12 Centrales de Abasto. (02-09-2003) [www.infoaserca.gob.mx/chiles/chs\\_4x3.asp](http://www.infoaserca.gob.mx/chiles/chs_4x3.asp)

**Azia, F. y Stewart, K.A.** 2001. Relationships between extractable chlorophyll and SPAD values in muskmelon leaves. *J. Plant Nut.*, 24 (6):961-966

**Belnap, J.** 1993. Recovery rates of cryptobiotic crusts: inoculant use and assessment methods. *Great Basin Naturalist* 53(1):89-95.

**Belnap, J.** 2001. Factors influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts. En: Belnap, J. y Lange O.L. (Eds.). *Biological soil crusts: structure, function and management*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Pp: 241-261

**Belnap, J. and Harper, K.T.** 1994. Influence of cryptobiotic soil crusts on elemental content of Tissue of Two Desert Seed Plants. *Arid Soil Res. Rehab.*, 9:107-115.

**Belnap, J., Harper, K. y Warren, S.** 1993. Surface disturbance of cryptobiotic soil crusts: nitrogenase activity, chlorophyll content, and chlorophyll degradation. *Arid Soil Res. Rehab.*, 8:1-8

**Belnap, J., Büdel, B. y Lange, O.L.** 2001a. Biological soil crusts: characteristics and distributions. En: Belnap, J. y Lange, O.L. (Eds.). Biological soil crusts: structure, function and management. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, pp: 3-30.

**Belnap, J. y Gardner, J.S.** 1993. Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. Great Basin Naturalist, 53 (1): 40-47.

**Belnap, J., Prasse, R. y Harper, K.T.** 2001b. Influence of biological soil crusts on soil environments and vascular plants. En: Belnap, J. y Lange, O.L. (Eds.). Biological soil crusts: structure, function and management. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, pp: 281-300.

**Beltrán Morales, A.** 2003. El Nitrógeno. Su impacto en la agricultura y en el ambiente. UABCS, La Paz, México, pp: 132

**Brown, L.R.** 1972. La producción humana de alimentos como un proceso en la Biosfera. En: La Biosfera, Alianza Editorial Madrid, p:192-218.

**Boussiba, S.** 1993. Production of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* in a closed tubular reactor for rice farming. Microb. Releases 2:35-39

**Bowker, M.A., Reed, S.C., Belnap, J. y Phillips, S.L.** 2002. Temporal variation in community composition, pigmentation, and Fv/Fm of desert cyanobacterial soil crusts. Microbial Ecol., 43(3):13-25.

**Büdel, B., Karsten, U. y Garcia Pichel, F.** 1997. Ultraviolet-absorbing scytonemin and mycosporin-like amino acid derivatives in exposed, rock-inhabiting cyanobacterial lichens. Oecologia 112:165-172.

**Buttars, S.M., St. Clair, L.L., Johansen, J.R., Sray, J.C., Payne, M.C., Webb, B.L., Terry, R.E., Pendleton, B.K y Warren, S.D.** 1998. Pelletized cyanobacterial soil

amendments: laboratory testing for survival, escapability, and nitrogen fixation. *Arid Soil Res.Rehab.*, 12(2):165-178

**Caire, G., Storni de Cano, M.M., Palma, R.M., Zaccaro, M.C.** In press. Changes in soil enzymes activity by cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biol. Biochem.*

**Campbell, R.** 1987. *Ecología microbiana*. Limusa. México.

**Campbell, S.E., Sèller, J. y Goulic, S.** 1989. Desert crust formation and soil stabilization. *Arid Soil Res. Rehab.*, 3:217-228

**Campbell, R.J., Kendrick, N.M., Marini, R. P. y Pfeiffer, D.G.** 1990. Growing conditions alter the relationship between SPAD-501 values and apple leaf chlorophyll. *HortScience* 25(3):330-331

**Carmichael, W.W.** 1986. Isolation, culture and toxicity testing of toxic freshwater cyanobacteria (blue-green algae). En: Shilov V(ed). *Fundamental research in homogeneous catalysis*. Vol. 3. New York: Gordon and Breach, pp: 1249-1262.

**Castenholz, R.W., Rippka, R., Herdman, M. y Wilmotte, A.** 2001. Subsection III. (Formerly Oscillatoriales). En: Boone DR y Castenholz RW (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer, pp. 539-562.

**Challenger, A.** 1998. *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, Presente y Futuro*. CONABIO. México, pp.

**Cliffe, K.** 2000. Biorreactores. En: Scragg, A. *Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Limusa, México, pp: 287-311

**Corona Torres, T., García Velásquez, A., Castillo González, F., Montero Tavera, V. y Azpiroz Rivero, H.S.** 2002. Nuclear DNA content variability in Pepper (*Capsicum annum* L. and *C. Chinense Jacq.*) from Mexico.

[www.inifap.conacyt.mx/publicaciones/cientifica/vol25num2.htm](http://www.inifap.conacyt.mx/publicaciones/cientifica/vol25num2.htm)

**De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R. y Vincenzini, M.** 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *J. Appl. Phycol.*, 13:293-299

**Delwiche, C.C.** 1972. El ciclo del Nitrógeno. En: *La Biosfera*. Alianza Editorial, Madrid, pp. 144-165.

**DuBois, J.D. y Kaputska, L.A.** 1983. Biological nitrogen influx in an Ohio relict prairie. *Amer. J. Bot.* 70(1):8-16

Eldridge, J.D. y Greene, R.S.B. 1994a. Microbiotic soil crusts: a review of thier roles in soil and ecological processes in the rangelands of Australia. *Austr. J. Soil. Res.* 32:389-415

**Eldridge, J.D. y Leys, J.F.** 2003. Exploring some relationships between biological soil crusts, soil aggregation and wind erosion. *J. Arid Environ.*, 53:457-466.

**Evans, R.D. y Johansen, J.R.** 1999. Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 18 (2):183-225.

**Fay, P.** 1983. *The Blue-Greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)*. The Institute of Biology's. *Studies in Biology* No. 160. The Camelot Press Ltd, Southampton, pp. 88.

**Fay, P.** 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews*, 56(2):340-373

**Fogg, G.E., Stewart, W.D.F., Fay, P. y Walsby, A.E.** 1973. *The blue-green algae*. Academic Press. London, pp. 459.

**Fritz Sheridan, R.P.** 1986. Nitrogen fixation on a tropical volcano, La Soufrière. II. Nitrogen fixation by *Scytonema* sp. and *Stereocaulon virgatum* Ach. during colonization of phreatic material. *Biotropica* 19(4):297-300.

**García Hernández, J.L.** 2001. Evaluación de la fitotoxicidad ocasionada por insecticidas en Chile (*Capsicum annum* L) cv. Ancho San Luis y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cv. Río Grande en La Paz, B.C.S. (México). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz. B.C.S.

**García Pichel F and Belnap J.** 1996. Microenvironments and microscale productivity of cyanobacterial desert crusts. *J. Phycol.* 32:774-782.

**García Pichel, F. y Castenholz, R.W.** 1991. Characterization and biological implications of Scytonemin, a Cyanobacterial Sheath Pigment. *J. Phycol.* 27:395-409.

**García Pichel, F., López Cortés, A. y Nübel, U.** 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Appl. Environ. Microb.*, 67(4):1902-1910.

**García Pichel, F. y Pringault, O.** 2001. Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature* 413:380-381

**Geitler, L.** 1932. Cyanophyceae. In: Kolkwitz U, editor. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland. Österreich und der Schweiz. Vol. 14. Leipzig: Akademische Verlag, p: 594-1146

**Guerrero, R.** 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley. 4ª Edición. Madrid, pp.: 411-424.

**Harper, K.T. y Pendleton, R.L.** 1993. Cyanobacteria and Cyanolichens: Can they enhance availability of essential minerals for higher plants?. *Great Basin Naturalist*, 53(1):59-72

**Hernández Lopez, J. y Vargas Albores, F.** A microplate technique to quantify nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in seawater. *Aquac. Res.* In press.

**Herrero A, Muro-Pastor AM and Flores E.** 2001. Minireview. Nitrogen control in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, 183(2):411-425

**Hoffmann, L. y Asencio, A.D.** 1999. Towards a taxonomic revision of the genus *Scytonema*: morphological, biochemical and molecular approaches. *Algological Studies*, 94:173-174.

**INEGI.2002a.** [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)

**INEGI.** 2002b. Núcleos agrarios tabulados básicos por Municipio. Programa de Certificación de Derechos Ejidales y Titulación de Solares. PROCEDE. Baja California Sur. [Página de internet](#)

**Jeffries, D.L, Klopatek, J.M., Link, S.O. y Bolton, Jr. H.** 1992. Acetylene reduction by cryptogamic crusts from a blackbrush community as related to restoration and dehydration. *Soil. Biol. Biochem.* 24(11):1101-1105.

**Johansen, J.R. y Rushforth, S.** 1985. Cryptogamic soil crusts: seasonal variation in algal populations in the Tinctin Mountains, Juab County, Utah. *Great Basin Naturalist*, 45(1):14-21

**Kalininskaya, T.A., Kravchenko, I.K. y Miller, Y.M.** 1989. Assimilation of nitrogen fixed by soil diazotrophs by rice plants. En: Vancura, V. y Kunc, F. (eds). *Interrelationships Between Microorganisms and Plants in Soil.* Elsevier, pp:269-271

- Kershaw, K.A.** 1985. Physiological ecology of lichens. Cambridge University Press, New York.
- Kleiner, E.F. y Harper, K.T.** 1972. Environment and community organization in grasslands of Canyonlands National Park. *Ecology* 53:299-309.
- Kleisinger, S.** 2002. Sensor development for the mobile measurement of humidity in turf root zones. <http://www.uni-hohenheim.de/i3ve/00217110/02416041.htm>
- Klubek, B., Eberhardt, P.J., y Skujins, J.** 1978. Ammonio volatilization from Great Basin Desert soils. En: West, N.E. y Skujins, J.L., Eds., Nitrogen in desert ecosystem. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc, Stroudsburg, pp 107-129.
- Kramer, P.J.** 1989. Relaciones hídricas de suelos y plantas. Una síntesis moderna. Ed. Harla. México.
- Kubeckova K, Johansen JR and Warren SD.** In press. Development of immobilized cyanobacterial amendments for reclamation of microbiotic soil crusts. *Algological Studies*.
- Lange, O.L, Kidron, G.J., Büdel, B., Meyer, A. Kilian, E. y Abeliovich, A.** 1992. Taxonomic composition and photosynthetic characteristics of the “biological soil crusts” covering sand dunes in the western Negev Desert. *Funct. Ecol.* 6:519-527
- Lenhinger, A.** 1985. Principios fundamentales de bioquímica. Omega, España, pp: 1013
- Lewis, O.A.M.** 1986. Plants and Nitrogen. The Institute of Biology's. Studies in Biology No. 166. Edward Arnold. Great Britain.
- Lindemann, W.C.** 1988. Present and future importance of soil microbiology in crop production. *Terra* 1(2):164-165
- Long Solís, J.** 1998. Capsicum y cultura: la historia del Chilli. Fondo de Cultura Económica. México, pp. 203.

- López Cortés, A.** 2003. Cianobacterias para agricultura orgánica. Énfasis Alimentación. 1:52-56
- López Cortés, A., García Pichel, F., Nübel, U. y Vázquez Juárez, R.** 2001a. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, México: a Polyphasic Study. *Int. Microbiol*, 4:227-236
- López Cortés, A., Maya Delgado, Y., Troyo Diéguez, E. y Landa Hernández, L.** 2001b. Cianobacterias Criptobióticas: Una alternativa de agricultura orgánica. Programa de Agricultura en Zonas Áridas. Publicación de Transferencia y Divulgación No. 7. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Fundación Produce Baja California Sur, A.C. y CONACYT, pp. 28.
- López Cortés, A. y Maya Delgado, Y.** 2003. Cryptobiotic cyanobacteria: an alternative in organic agriculture. *Algological Studies*. 109:387-394
- López Torres, M.** 1995. Resistencia de las plantas. Trillas. México.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.** 2001. Brock. Biología de los microorganismos. 8ª edición revisada. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Manual de Frascati.** 1993. Medición de las actividades Científicas y tecnológicas. Propuesta de norma práctica para encuestas de investigación y desarrollo experimental. OCDE., Madrid, pp. 339
- Marison, I.W.** 2000. Cinética de crecimiento. En: Scragg, A. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Limusa. México, pp: 191-225
- Maya, Y., López Cortés, A. y Soeldner, A.** 2002. Cyanobacterial microbiotic crust in eroded soils of tropical dry Forest in the Baja California Peninsula, Mexico. *Geomicrobiol. J.*, 19:505-518.



**Metting, B.** 1991. Biological surface features of semiarid lands and deserts. En: Skujins, J., (Ed), Semiarid lands and deserts: soil resource and reclamation. Pp: 257-293. Marcel Dekker, New York.

**Nieto Garibay, A.** 1994. Evotranspiración y relaciones hídricas de un cultivo hortícola integrado a un sistema desalador cosetero. Tesis para obtener el grado académico de Biólogo. Universidad Autónoma de México.

**Nieto Garibay, A.** 2000. Relaciones suelo-planta-atmósfera de una línea semidomesticada de chile (*Capsicum frutescens*) bajo tratamientos de abono orgánico y fertilizante químico. Tesis para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias (Ecología y Ciencias Ambientales). Universidad Autónoma de México.

**Ortiz Villanueva, B. y Ortiz Solorio, C.A.** 1990. Edafología. Universidad Autónoma Chapingo. México, pp: 394

**Palmer, R.J. y Friedmann, E.I.** 1990. Water relations, photosynthesis, and thallus structure of Negev Desert lichens. *New Phytol.*, 116:597-603.

**Penman, H.L.** 1972. El ciclo del agua. En: Scientific American (Ed). La Biosfera. Alianza Editorial, Madrid, pp.: 80-101

**Proteau, P.J., Gerwick, W.H., Garcia Pichel, F., y Castenholz, R.** 1993. The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia* 49:825-829

**Ramírez, J.** 2001. Principales variedades *Capsicum* (chile). Regional Agricultural Association from the South of Tamaulipas. 16<sup>th</sup> International Pepper Conference.

[www.pepperconference.org/PepperConference/informacion\\_variedades\\_de\\_chile.htm](http://www.pepperconference.org/PepperConference/informacion_variedades_de_chile.htm)

**Ramírez, J.** 2002. El chile. Conabio Biodiversitas (8). (accesada desde septiembre del 2003)

[www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/chile.htm](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/chile.htm)

**Riley, M., Orr, M.J. y Johansen, J.R.** 2001. Cyanobacterial inoculants for land reclamation. Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents 1246(2):p No pagination May 8. Patent Number: US6228136.

**Rippka, R.** 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. En: Abelson, J.N. y Simon, M.I. Methods in Enzymology Volume 167, Cyanobacteria. Packer, L. y Glazer, A.N. Academic Press, Inc. San Diego, USA. Pp: 3-27

**Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M y Stanier, R.Y.** 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. Journal of Genetic Micorbiology, 111:1-61

**Rippka, R., Waterbury, J.B. and Stanier, R.Y.** 1986. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. En: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A and Schlegel H. The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Vol I. Springer-Verlag. Pp: 216–219

**Sakata Seed de México, S.A. de C.V.** 2002. Creado por Milenium. Copyright © 2000-2003. [www.sakata.com.mx/paginas/ptchile.htm](http://www.sakata.com.mx/paginas/ptchile.htm) (accesada en septiembre del 2003)

**Salisbury, F.B. y Ross, C.W.** 1985. Plant physiology, 3<sup>rd</sup> ed., Wadsworth, Belmont, California, pp. 540.

**Singh, S. y Singh, J.S.** 1995. Microbial biomass associated with water-stable aggregates in forest, savannah and cropland soils of a seasonally dry tropical region. Indian Soil Biol. Biochem. 27(8):1027-1033.

**Sivakumar, M.V.K. y Glinni, A.E.** 2002. Applications of crop growth models in the semiarid regions. En: Ahuja, L.R., Ma, L. y Howell, T.A. Agricultural system models in field research and technology transfer. CRC Press Lewis Publishers, Washington D.C., <http://www.crcpress.com>

**Slatyer, R.O.** 1967. Plant-Water relationships. Academic Press. London, pp: 366

**St. Clair, L.L. y Johansen, J.** 1993. Introduction to the symposium on soil crust communities. The Great Basin Naturalist, 53(1):1-4

**St. Clair LL, Webb BL, Johansen JR and Nebeker GT.** 1984. Cryptogamic soil crusts: enhancement of seedling establishment in disturbed and undisturbed areas. Reclamation and Revegetation Research, 3:129-136

**Staal, M., te Lintel Hekkert, S., Herman, P. and Stal, L.J.** 2002. Comparison of models describing light dependence of N<sub>2</sub> fixation in heterocystous cyanobacteria. Appl. Environ. Microb., 68(9):4679-4683

**Storni, M., Zaccaro, M.C., Zulpa, G., Rodríguez, A. y Stella, A.M.** s/A. Effect of *Scytonema hofmanni* (cianobacteria) extracellular products on the metabolism of Salinity Stressed Rice Seedlings. <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/storni.pdf>

**Syrett, P.J.** 1981. Nitrogen Metabolism of Microalgae. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci, 210:182-210

**Tandeau De Marsac y Houmard, J.** 1988. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and actino spectra. En: Methods in Enzymology, vol. 167, pp: 318-328

**Thiel, T. y Pratte, B.** 2001. Effect on Heterocyst Differentiation of Nitrogen Fixation in Vegetative Cells of the Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC29413. J. Bacteriol., 183(1):280-286.

**Titus, A. y Pereira, G.N.** 2003. Bio-fertilizers for coffee plantations.

[www.IneedCoffee.com](http://www.IneedCoffee.com)

**Tiwari, D.N., Kumar, A. y Mishra, A.K.** 1991. Use of cyanobacterial diazotrophic technology in rice agriculture. Appl. Biochem. Biotech. 28/29:387-396

**Tomašić, Z.** 1996. Soil erosion on several longitudinal slopes of a trial skid trail over a four-year period (1992-1996). <http://www.fao.org/docrep/x0622e0v.htm>

**UNSO.** 1997. Aridity zones and dryland populations, an assessment of population levels in the world's drylands. Office to Combat Desertification and Drought (UNSO) United Nations Development Pro-gramme (UNDP), 23pp. New York.

**Vaishampayan, A., Sinha, R.P. y Hader, D.P.** 2001. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. Bot. Rev. 67 (4): 453-516

**Verrecchia, E., Yair, A., Kidron, G.J. y Verrecchia, K.** 1995. Physical properties of the psammophile cryptogamic crust and their consequences to the water regime of sandy soils, north-western Negev Desert, Israel. J. Arid Environ. 29:427-437.

**Vonshak, A.** 1985. Micro-algae: Laboratory growth techniques and outdoor biomass production. En: Coombs J, Hall DO y Jong SP (eds). Techniques in bioproductivity and photosynthesis. Pergamon Press, Oxford and UNEP, pp:188-200.

**Watanabe, I.** 1984. Use of symbiotic and free-living blue-green algae in rice culture. Outlook Agr. 13:166-172.

**West, N.E.** 1990. Structure and function of microphytic soil crusts in wildland ecosystems of arid to semi-arid regions. *Adv. Ecol. Res.* 20:45-53

**Yadava, U.L.** 1986. A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *Hortscience* 21(16):1449-1450.

**Zaccaro, M.C.** 2000. Plant growth-promoting cyanobacteria. PGPR Conference.

**Zulpa de Caire, G. y Palma, R.M.** 1999. Mejoramiento de suelos degradados por aplicación de cianobacterias. Efecto sobre plantas de trigo y maíz.

## Anexo I. Heterocistos

### *Descripción*

La composición celular del tricoma de las cianobacterias filamentosas es por lo general heterogénea, existen tres tipos de células: las vegetativas, los acinetos y los heterocistos.

Los heterocistos son células especializadas que fijan nitrógeno molecular ( $N_2$ ) (Fay, 1983; Canstenholz, 2001). No todas las cianobacterias filamentosas tienen la capacidad de desarrollar heterocistos, sólo aquellas que se encuentran dentro de dos grupos monofiléticos los cuales corresponden a los órdenes de Nostocaceae y Stigonematales (Fay, 1983).

Los heterocistos son fácilmente reconocibles bajo el microscopio óptico ya que normalmente son más grandes que las células vegetativas, desarrollan paredes gruesas poco pigmentadas, tienen septos que los unen a las células vegetativas y presentan por lo general un color amarillo pálido, se encuentran a intervalos más o menos regulares entre las células vegetativas. (Fig. 2) (Fay, 1983).

### *Desarrollo de los heterocistos*

Según restos fósiles de cianobacterias de hace 3 mil millones de años, se piensa que la habilidad de fijar  $N_2$  se desarrolló durante esta etapa temprana de la evolución biológica, cuando la atmósfera tenía condiciones reductoras, ya que no se puede fijar  $N_2$  en presencia de  $O_2$  (Fay, 1983).

Los heterocistos se forman a partir de células vegetativas que transformaron su morfología, estructura y bioquímica en respuesta a una carencia de nitrógeno combinado en el ambiente, principalmente amonio y nitrato (Fay, 1983) que se refleja en la proporción C:N (Fogg, *et al.*, 1973). Estas células pueden desarrollarse en el extremo del tricoma o estar

intercaladas entre las células vegetativas, la posición relativa de los heterocistos parece estar determinada genéticamente por los genes *nif*. Se asume que un heterocisto es capaz de proveer de nitrógeno fijado al número de células vegetativas que se encuentran entre un heterocisto y otro, y a su vez las células vegetativas proveen al heterocisto de sustancias orgánicas requeridas como fuente de energía, agentes reductores y además devuelven el N recién fijado en compuestos orgánicos combinados (Fay, 1983; Fogg *et al.*, 1973).

Durante el periodo inicial de limitación de N la relación C:N incrementa de 4.5 a 8, las reservas de N (cianoficinas y ficobiliproteínas) empiezan a disminuir (Steinbüchel, 2002). En un estado de severa privación de nitrógeno, que se refleja en la relación C:N (8:1 en *Anabaena cylíndrica*), se dispara el estímulo que produce la diferenciación celular hacia el heterocisto. Casi la mitad de las proteínas se degradan y muchas otras nuevas se sintetizan, la enzima nitrogenasa se sintetiza al final de la diferenciación. Se re-organiza el sistema de membranas, los tilacoides periféricos se desintegran y se reemplazan con un nuevo y elaborado sistema de membranas que rodean el citoplasma. Una serie de capas se deposita en la superficie externa de la pared celular original que incluye casi todo el heterocisto excepto las áreas reducidas de contacto con las células vecinas. Estas áreas reducidas (septos) están atravesadas por unos pocos canales finos (microplasmodesmas) que cruzan la pared y se asume que son las rutas metabólicas de intercambio entre el heterocisto y las células vecinas. Las capas externas están compuestas por polisacáridos y la capa intermedia contiene complejos glicolípidos que se cree que actúan como barreras permeables al movimiento de moléculas dentro del heterocisto y que controlan, pero no previenen, la difusión de gases (Fay, 1983).

Los heterocistos retienen cantidades significativas de clorofila a y carotenoides pero no de ficobiliproteínas. En la diferenciación celular el fotosistema II (que fija CO<sub>2</sub> y libera O<sub>2</sub>) se pierde mientras que las unidades del fotosistema I (anóxico) incrementan para proveer al sistema de moléculas de ATP como fuente de energía ya que la fijación de N<sub>2</sub> requiere 12-15 ATP por N<sub>2</sub> fijado. La fijación de nitrógeno se localiza en estos heterocistos, donde la nitrogenasa, que es sensible al oxígeno, está protegida de la producción fotosintética de oxígeno que lo inactivaría. Entre las células normales y los heterocistos existe un intercambio activo; las células normales proporcionan disacáridos generados por fotosíntesis a los heterocistos y éstos les aportan formas fijadas de nitrógeno, como la glutamina (Fay, 1983).

### ***Proceso de fijación de nitrógeno***

En el proceso de fijación el N<sub>2</sub> se reduce a amoníaco, que es convertido a forma orgánica (Fig. 35). El proceso de reducción está catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa (Nasa), que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y reductasa de la dinitrogenasa. Ambas proteínas contienen hierro y la dinitrogenasa también contiene molibdeno. En la dinitrogenasa, el hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor conocido como FeMo-co, que es el centro donde ocurre la reducción real del N<sub>2</sub>. Bajo ciertas condiciones de crecimiento, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden sintetizar nitrogenasas sin molibdeno; estas nitrogenasas alternativas contienen vanadio (más hierro) o hierro solo, y no se sintetizan en presencia de molibdeno, por lo que parecen servir de mecanismo de apoyo para asegurar que ocurra la fijación de N<sub>2</sub> incluso cuando el Mo es un factor limitante (Madigan *et al.*, 2001).



Debido a la estabilidad del triple enlace  $N \equiv N$  (que tiene una energía de disociación de 940 KJ comparada con 493 KJ para  $O_2$ ), el  $N_2$  es muy inerte y su activación es un proceso que requiere mucha energía. Se deben transferir seis electrones para reducir el  $N_2$  a  $NH_3$  a través de una posible serie de pasos intermedios. La fijación de nitrógeno en la naturaleza es muy reductora y el proceso se inhibe por oxígeno porque tanto la dinitrogenasa como la reductasa de la dinitrogenasa se inactivan rápida e irreversiblemente por  $O_2$  (Madigan *et al.*, 2001).

La fijación de nitrógeno requiere de un sustrato,  $N_2$ , un donador de electrones, ATP, ferredoxina o flavodoxina, nitrogenasa, un ambiente anaeróbico y reductor para poder operar. El recurso de electrones difiere entre organismos, puede ser NADH, NADPH y piruvato (Lewis, 1986). De una manera simplificada, la secuencia de transferencia de electrones en la Nasa es como sigue: donador de electrones (NADH, NADPH, piruvato)  $\rightarrow$  reductasa de la nitrogenasa  $\rightarrow$  dinitrogenasa  $\rightarrow N_2 \rightarrow 2NH_3$ . Los electrones para la reducción del nitrógeno se transfieren a la reductasa de la Nasa desde la ferredoxina o la flavodoxina, proteínas de bajo potencial que contienen hierro y azufre (Madigan *et al.*, 2001).

Además de ferredoxina reducida se necesita ATP para la fijación de  $N_2$ . el requerimiento de ATP en la fijación de nitrógeno es muy alto, con 4-5 ATPs hidrolizados por cada 2e- transferidos. El ATP se necesita para bajar el potencial de reducción de la nitrogenasa lo suficiente de modo que el  $N_2$  se pueda reducir. El potencial de reducción de la reductasa de la dinitrogenasa es  $-0.30$  V y se baja a  $-0.40$  V cuando se transfieren electrones a la enzima y la enzima hidroliza ATP. Este complejo se combina luego con la dinitrogenasa, que pasa a ser reducida. La dinitrogenasa reducida reduce a continuación el  $N_2$  hasta  $NH_3$  y la

reducción real ocurre en el centro FeMo-co. Aunque sólo se necesitan seis electrones para reducir  $N_2$  a  $2NH_3$ , en el proceso se consumen en realidad ocho electrones, de los cuales dos se pierden como hidrógeno ( $H_2$ ) por cada mol de  $N_2$  reducido (Madigan *et al.*, 2001).

Los genes de la dinitrogenasa y de la reductasa de la dinitrogenasa son parte de un complejo regulón (un gran sistema de operones) llamado regulón *nif*. La nitrogenasa está sometida a controles regulatorios muy estrictos. La fijación de nitrógeno se bloquea por  $O_2$  y por nitrógeno fijado, incluyendo  $NH_3$ ,  $NO_3^-$  y algunos aminoácidos. La mayor parte de esta regulación es a nivel transcripcional, del regulón *nif*. El amoníaco producido por la nitrogenasa no reprime la síntesis de la enzima porque tan pronto como se forma se incorpora a forma orgánica y se usa en biosíntesis. Pero cuando el amoníaco está en exceso (como cuando hay altos niveles en el medio), la síntesis de nitrogenasa se reprime rápidamente. Esto evita desperdiciar ATP haciendo un producto que ya está presente en gran cantidad (Madigan *et al.*, 2001).

La nitrogenasa se ha purificado de un gran número de organismos fijadores de nitrógeno y en todos los casos se ha visto que es un complejo de dos proteínas. Entre las nitrogenasas con molibdeno, la dinitrogenasa de un organismo puede normalmente funcionar con la reductasa de la dinitrogenasa de otro organismo, lo que tiene un considerable interés evolutivo. Este resultado se puede interpretar en el sentido de que las estructuras de los componentes de la nitrogenasa no han cambiado mucho durante la evolución, lo que sugiere que los requerimientos moleculares para la reducción del  $N_2$  son bastante específicos. Se han hecho estudios con sondas moleculares conteniendo genes *nifHDK* clonados de una bacteria fijadora de nitrógeno que hibridan con el DNA de prácticamente

todos los fijadores de N<sub>2</sub> pero no con DNA de bacterias no fijadoras de N<sub>2</sub> (Madigan *et al.*, 2001).

La nitrogenasa no es por completo específica para el N<sub>2</sub> ya que también puede reducir varios compuestos con triples enlaces, como el acetileno (HC ≡ CH). La reducción del acetileno por la Nasa es un proceso en el que intervienen dos electrones y se produce etileno (H<sub>2</sub>C=CH<sub>2</sub>). Probablemente la producción de acetileno no tiene utilidad alguna para la célula, pero suministra al experimentador un medio sencillo y rápido de ensayar la actividad de sistemas fijadores de nitrógeno, por que es relativamente fácil medir la reducción de acetileno a etileno por cromatografía de gases (Madigan *et al.*, 2001).

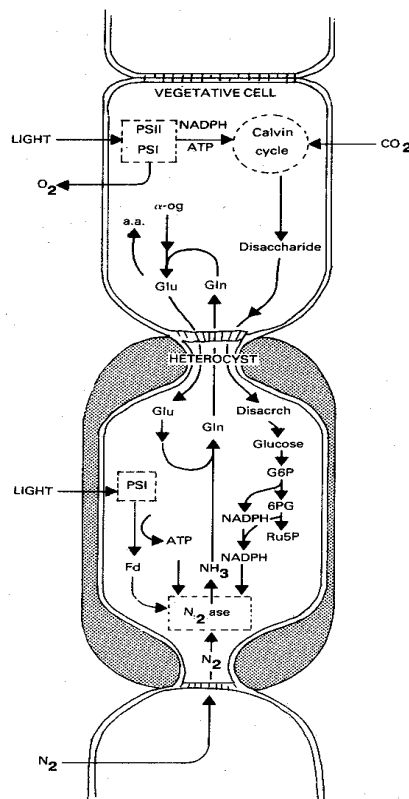


Figura 35. Proceso de fijación de nitrógeno en un heterocisto. Figura tomada de Fay, P. (1983). *The Blue-Greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)*. The Institute of Biology's. Studies in Biology No. 160. The Camelot Press Ltd, Southampton.

## **Anexo II. *Capsicum annuum* L.**

### ***Origen***

El *Capsicum*, conocido popularmente como *chile* o *aji*, es originario de América. Algunos arqueólogos lo consideran una de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica, restos de chile muy parecidos a los actuales encontrados en localidades prehispánicas, fechados entre 7000 y 5000 años a.C., hacen pensar que la domesticación del chile precede a la del maíz, el frijol y la calabaza (Long-Solís, 1998; Ramírez, 2002).

### ***El chile en el mundo***

El chile tiene una larga tradición cultural en México (ver Anexo III. Leyenda de Chile en Tula) y forma parte de la dieta del mexicano en todos los niveles sociales, fray Bernardino de Sahagún escribió que desde los manjares exclusivos del emperador hasta los modestos bocados de los plebeyos se consumía en abundancia esta hortaliza (Ramírez, 2002). En el siglo XVI, el fraile Bartolomé de las Casas observó que “sin el chile, los mexicanos no creen que están comiendo”, por su parte, Francisco Clavijero en el siglo XVIII y Alejandro von Humbolt en el siglo XIX comentaron que se usaba tanto chile entre los mexicanos como la sal entre los europeos. Hoy por hoy, el chile es uno de los atributos que identifican al mexicano en todo el mundo (Long-Solís, 1998).

El gusto por el chile no es exclusivo del continente Americano, desde que el chile llegó a España se extendió a varios países Europeos, Asiáticos y Africanos convirtiéndose así en un cultivo de uso mundial. Incluso ha llegado a ser un condimento indispensable de platillos nacionales de países como India, Hungría y otros.

México es el país con la mayor variedad genética de *Capsicum*, sin embargo, se encuentra en el sexto lugar de producción mundial por debajo de China, España, Turquía, Nigeria y la India. La baja producción de México se debe principalmente al bajo nivel de tecnología y al uso de cultivos criollos. Los costos de producción así como el precio del producto son muy altos y hacen que éste no pueda competir con el de otros países que tienen menores precios. En China, por ejemplo, los precios del chile son la mitad de los de México. Esto ha propiciado que los comercializadores mexicanos prefieran ahora importar chile (Ramírez, 2002).

### ***Capsicum***

Todos los chiles son del género *Capsicum* de la familia de las Solanáceas. Los estudiosos coinciden en que hay 5 especies de chile cultivadas o silvestres: *Capsicum baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*, ésta última es la más importante ya que agrupa a la mayor parte de los chiles cultivados y silvestres (Ramírez, 2002).

El *Capsicum annuum* variedad *annuum*, Smith y Heiser (citado en Long-Solís, 1998) los describe como plantas cultivadas que crecen a una altura de 30 a 75 cm, según el tipo de chile. Los pedúnculos son solitarios, rara vez se presentan en pares, en el mismo nódulo, y generalmente están colgantes. La corola de las flores es de tono blanco lechoso con antenas azules o moradas, el cáliz dentado. Existe una gran variedad en la forma y tamaño del fruto, de tono verde o amarillo en el estado tierno y rojo, amarillo o café en el maduro. Las semillas tienen forma de embrión redondeado y varían en tono de crema a amarillo. El grupo incluye tanto los chiles dulces como los muy picantes. Casi todos los chiles cultivados en México pertenecen a la variedad *annuum* y son el grupo de mayor

importancia económica y distribución geográfica en el mundo (Long-Solís, 1998). Tiene la ventaja de ser un cultivo fácilmente adaptable a diversas condiciones de clima, suelos y altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm (Long Solís, 1998; Ramírez, 2002).

El sabor picante del *Capsicum* está determinado por la cantidad de capsicina ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ) en el fruto, se encuentra principalmente en la placenta, su grado de escozor cambia según la variedad del chile y la relación del tejido placentar con sus paredes, por lo que los pequeños suelen ser más picosos que los de fruto grande (Long-Solís, 1998).

### ***Chile Poblano-Ancho***

Se conocen diferentes tipos de *Capsicum*, a los cuales se le designan adjetivos para poder distinguir los distintos tipos de chile según su fenotipo (largo, ancho, verde, güero), procedencia (poblano, jalapeño) y estado de maduración (verdes o secos) (Long-Solís, 1998).

El chile poblano al deshidratarse se convierte en chile ancho o mulato, dependiendo de si madura en tonos de rojo oscuro o achocolatado casi negro. El poblano de óptima calidad es grande, de más de 10 cm de largo y 6 de ancho, de forma cónica o cónica-truncada, con una hendidura bien definida en la unión del pedúnculo, de paredes gruesas. Es medianamente picante, de aroma fuerte y agradable. Hay tres tipos de poblano fresco: verde, negruzco y en forma de corazón. El de más alta producción es el poblano verde que al madurar se le da el nombre de chile ancho (Long-Solís, 1998).

Este chile se domesticó en el valle de Puebla, después se desplazó al Bajío y a Zacatecas (Ramírez, 2001). Las zonas productoras más importantes están en los valles semiáridos del

centro del país en el ciclo primavera/verano, y en la temporada de invierno se siembran en la zona costera del Pacífico (Long-Solís, 1998). El estado de Zacatecas es el principal productor a nivel nacional que surte a las centrales de abasto de Guadalajara, Monterrey, Hermosillo, Culiacán, León, Querétaro y Torreón (ASERCA, 2003).

El chile poblano es muy vulnerable al exceso de humedad o inundación por lo que es recomendable hacer surcos o camas altas. Si el cultivo se encuentra bajo riego rodado es recomendable aplicar un fertilizante nitrogenado y todo el fósforo en el suelo al momento de la preparación del surco, después del transplante es recomendable aplicar 100 kg de nitrato de amonio y volver a aplicar 100 kgs de nitrato de amonio después de la floración en amarre de fruto, es necesario también monitorear bien la humedad del terreno y el número de riegos que se le suministren al cultivo ya que esta variedad tiene raíces grandes y vigorosas, un tallo leñoso por lo que la humedad debe ser constante para lograr un mejor desarrollo, se recomienda regar una vez por semana o cada 10 días, se deben hacer aplicaciones periódicas de Ca, Mg y B para darle consistencia, buen amarre y color al fruto. Es recomendable también aplicar microelementos de manera periódica como Fe, Zn y B, ya que la planta es vigorosa y es muy importante el uso de estos elementos hasta antes de la floración, con el fin de lograr el máximo de fructificación. El pH del suelo y agua debe de ser alrededor de 6.0 a 6.5 para lograr un mejor desarrollo de la variedad y lograr una mejor absorción y disponibilidad de nutrientes en la planta (Sakata Seed de México, 2002).

### ***Aplicaciones del chile***

El chile tiene varias aplicaciones en diversas ramas de la industria, se le extraen oleorresinas o extractos solubles que son utilizadas para dar sabor a los alimentos (carnes

frías, salsas, etc.) y como colorante natural en alimentos y cosméticos, en la industria avícola se mezcla con el alimento para producir la yema más rojiza, en la industria farmacéutica se utiliza como estimulante y anestésico además de que se conoce su gran valor vitamínico, en la industria tabacalera, en la fabricación de pintura marina y en la elaboración del gas pimienta. (Long-Solís, 1998; Ramírez, 2002).

### **Leyenda de Chile en Tula**

Hay una leyenda histórica narrada en el libro de Bernardino de Sahún acerca de un vendedor itinerante de chiles en el mercado de Tula de la época del rey Huémac, último soberano de los toltecas, de quien se dice tenía una hija muy hermosa que, por su misma belleza, fue codiciada y deseada por muchos que pretendían casarse con ella. Un día el vendedor se presentó en el tianguis totalmente desnudo, como era la costumbre de su gente, los huastecos. La hija del rey lo vio, con toda su desnudez, y comenzó a enfermarse del antojo, y por amor de “aquello que vio” se le hinchó todo el cuerpo y se puso muy enferma. Cuando el rey Huémac preguntó por su hija le informaron que estaba “mala de amores”. Mandaron a buscar al vendedor y lo encontraron sentado en el mercado, nuevamente vendiendo chiles. Huémac le reclamó no llevar *maxtlatl* par cubrirse y el chilero le respondió aduciendo que era la costumbre de su tierra. El soberano, entonces, le insistió: “vos antojasteis a mi hija, vos la habéis de sanar”. Después, la hija sanó y el vendedor se convirtió en el yerno del rey.

Los toltecas, que habían deseado a la bella princesa, no estaban de acuerdo en que se casara con un humilde vendedor de chile y protestaron ante el rey, quien, a su vez, decidió mandarlo a la guerra para que ahí lo mataran. Como lo habían previsto, durante la batalla



los toltecas lo dejaron solo ante el enemigo y huyeron para avisarle a Huémac, quien pensó que ya estaba muerto y se alegró mucho, ya que se avergonzaba de tener un yerno de ese nivel.

El chilero salió victorioso cuando dio muerte a muchos enemigos. Al enterarse Huémac de los resultados se atemorizó y se acongojó mucho; sin embargo, mandó preparar la fiesta de la victoria que solía hacerle a los guerreros triunfantes.

Los toltecas aceptaron al vendedor como su compatriota, después del temple y valentía que había mostrado y se sintieron complacidos con los hechos. En realidad, no se trataba de un simple vendedor itinerante de chiles sino del dios Titlacauan (Tezcatlipoca) quien había engañado a los toltecas, como en otras ocasiones (tomado de Long-Solís, 1998).

Anexo III. Medio de Cultivo Z8<sup>0</sup>

Reactivo	g sal/1L H <sub>2</sub> O para sol. stock	mL stock/L H <sub>2</sub> O para el medio
<b>Sales Principales</b>		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.6	10
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.5	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	3.1	10
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.1	10
<b>Fe-EDTA-Na<sub>2</sub></b>	Se explica adelante	10
<b>Elementos Traza</b>	Se explica adelante	1

\* El medio de cultivo original contiene Fosfato de Potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pero por omisión del autor se aplicó Fosfato de Potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

**Fe-EDTA-Na<sub>2</sub>:**

10 mL de solución de FeCl<sub>3</sub> ( 2.8 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O disueltos en 100 mL de HCl 0.1N) y 9.5 mL de solución de EDTA (3.9 g EDTA-Na<sub>2</sub> disueltos en 100 mL de NaOH 0.1N). Mezclar y aforar a 1 L.

**Elementos Traza:**

Las siguientes cantidades de sales en gramos son para preparar 500 mL. Las sales se deben disolver en 360 mL de agua, considerando que se adicionarán 140 mL de las otras soluciones.

Sales	g/500 mL
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.165
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.44
KBr	0.6
KI	0.415

Adicionar 50 mL de cada una de las siguientes dos soluciones a la solución stock de elementos traza:

Sales	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.1 g/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.23 g/L

Adicionar 5 mL de cada una de las siguientes soluciones a la solución stock de elementos traza.

Sales	g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.87
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.55
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.46
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.25
NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.98
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.41
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.089
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	4.74

Llevar a un volumen total de un litro para la solución de elementos traza.

Los ingredientes de este medio no deben ser esterilizados juntos en el autoclave. Cada componente debe ser esterilizado por filtración en forma independiente, para posteriormente ser adicionados a agua estéril (López-Cortés *et al.*, 2001).

**Anexo IV. Solución Fertilizante Hoagland**

Preparación de solución mineral Hoagland (Taiz y Zeiger, 1998) al 50% en 250 mL de agua.

Compuesto	Concentración de la solución stock (cuarta parte de la original)	Volumen de la solución stock por litro de solución	Volumen de la solución stock por 1.5 litros de solución
	gL <sup>-1</sup>	mL	mL
<b>Macronutrientes</b>			
KNO <sub>3</sub>	25.275	3	4.5 x A = B mL*
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	34.62	2	3 x A = B mL*
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	28.77	1	1.5 x A = B mL*
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	26.65	0.5	0.75 x A = B mL*
<b>Micronutrientes</b>			
KCl	0.466		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.19325		
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.04225		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.072	1	1.5 x A = B mL*
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0155		
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01425		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12.5	0.15	0.225 x A = B mL*
Ácido tartárico	1		

La suma de mililitros del volumen de 1.5 L es igual a 11.474 mL.

\* Son los mL calculados para preparar 1.5 L de solución Hoagland al 50%, se multiplican por el número de tratamientos aplicados (A).

Los macronutrientes se preparan por separado y se almacenan en 4 recipientes de 1 L cada una. Los micronutrientes se preparan de la misma forma que los macronutrientes, pero en este caso se pueden adicionar todos en 1 L de solvente (agua). El FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O debe mantenerse por separado, para preparara 250 mL:

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (5\%) = 12.5 \text{ g}$$

$$\text{Ácido tartárico} (0.4\%) = 1 \text{ g}$$

Guardar las soluciones en refrigeración en frascos cubiertos con aluminio.

En un recipiente se combinan todos nutrientes en las cantidades calculadas (\*). De ésta combinación se tomarán 11.5 mL y se vacían en el 1.5 L de cada tratamiento. De tal manera que al momento del riego se toma de cada cubeta de 19 L, 1.5 L a los cuales se les agrega los 11.5 mL de solución Hoagland al 50%.

**Anexo V. Sumario de Experimentos de Producción de Biomasa**

Los siguientes datos fueron utilizados para escribir la parte de los resultados titulada “Optimización de la producción de biomasa de *Scytonema ocellatum*”

No.	Sistema	Vol. / Vol.		Foto- periodo	Intensidad $\mu E m^{-2} s^{-1}$	T° C	Días de incub.	Unidades medición	Biomasa		n	tg	K	K	$\mu$	$\mu$
		mtrz	Z8 <sup>0</sup>						X <sub>0</sub>	X <sub>t</sub>						
1	Aireación	250	150	24	130	23 ± 1	20	ml	0.2	10						
								mg	16.42	1079.72	6.0403.311	0.302	0.013	0.209	0.009	
2	Aireación	250	150	24	130	23 ± 1	20	ml	0.2	10						
								mg	16.42	1079.72	6.0403.311	0.302	0.013	0.209	0.009	
3	Aireación	250	150	24	130	23 ± 1	20	ml	0.2	10						
								mg	16.42	1079.72	6.0403.311	0.302	0.013	0.209	0.009	
4	Aireación	250	175	24	200	23 ± 1	8	ml	1.5	3						
								mg	157.4699320.21991.0247.812	0.128	0.005	0.089	0.004			
5	Aireación	250	175	24	200	23 ± 1	8	ml	1.5	3						
								mg	157.4699320.21991.0247.812	0.128	0.005	0.089	0.004			
6	Aireación	250	175	24	200	23 ± 1	8	ml	1.5	3						
								mg	157.4699320.21991.0247.812	0.128	0.005	0.089	0.004			
7	Aireación	250	175	24	200	23 ± 1	8	ml	1.5	3						
								mg	157.4699320.21991.0247.812	0.128	0.005	0.089	0.004			
8	Aireación	250	175	24	200	23 ± 1	8	ml	1.5	3						
								mg	157.4699320.21991.0247.812	0.128	0.005	0.089	0.004			
9	Aireación	250	175	24	200	23 ± 1	8	ml	1.5	3						
								mg	157.4699320.21991.0247.812	0.128	0.005	0.089	0.004			
10	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	26	ml	1	18						
								mg	103.22	1947.72	4.2386.134	0.163	0.007	0.113	0.005	
11	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	26	ml	1	20						
								mg	103.22	2164.72	4.3915.921	0.169	0.007	0.117	0.005	
12	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	26	ml	1	21						
								mg	103.22	2273.22	4.4615.828	0.172	0.007	0.119	0.005	
13	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	26	ml	1	12						
								mg	103.22	1296.72	3.6517.120	0.140	0.006	0.097	0.004	
14	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	26	ml	1	19						
								mg	103.22	2056.22	4.3176.023	0.166	3.985	0.115	0.005	
15	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	26	ml	1	16						
								mg	103.22	1730.72	4.0686.391	0.156	3.755	0.108	0.005	
16	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	26	ml	1	20						
								mg	103.22	2164.72	4.3915.921	0.169	4.053	0.117	0.005	
17	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	35	ml	1	15						
								mg	103.22	1622.22	3.9758.806	0.114	2.725	0.079	0.003	
18	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	35	ml	1	15						
								mg	103.22	1622.22	3.9758.806	0.114	2.725	0.079	0.003	
19	Aireación	500	300	24	200	23 ± 1	40	ml	1	25						
								mg	103.22	2707.22	4.7138.486	0.118	2.828	0.082	0.003	

Anexo V. Sumario de experimentos de producción de biomasa 133

Sistema	Vol. / Vol.		Fotoperiodo	Intensidad	T° C	t (días)	Unidades	Biomasa		n	tg	K	K	μ	μ
	mtrz	Z8 <sup>0</sup>						medición	X <sub>0</sub>						
				μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>											
20	Aireación	500 / 300	24	200	23 ± 1	41	ml	1	20						
							mg	103.22	2164.72	4.391	9.338	0.107	0.004	0.074	0.0031
21	Aireación	500 / 300	24	200	23 ± 1	45	ml	1	28						
							mg	103.22	3032.72	4.877	9.226	0.108	0.005	0.075	0.0031
22	Aireación	500 / 300	24	200	23 ± 1	45	ml	1	28						
							mg	103.22	3032.72	4.877	9.226	0.108	0.005	0.075	0.0031
23	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	1.4						
							mg	103.22	146.62	0.506	63.190	0.016	0.001	0.011	0.0005
24	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	2						
							mg	103.22	211.72	1.037	30.872	0.032	0.001	0.022	0.0009
25	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	1.4						
							mg	103.22	146.62	0.506	63.190	0.016	0.001	0.011	0.0005
26	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	1.4						
							mg	103.22	146.62	0.506	63.190	0.016	0.001	0.011	0.0005
27	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	2						
							mg	103.22	211.72	1.037	30.872	0.032	0.001	0.022	0.0009
28	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	1.5						
							mg	103.22	157.47	0.609	52.509	0.019	0.001	0.013	0.0005
29	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	1.8						
							mg	103.22	190.02	0.881	36.342	0.028	0.001	0.019	0.0008
30	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	3						
							mg	103.22	320.22	1.634	19.590	0.051	0.002	0.035	0.0015
31	Agitación	500 / 300	12	100	25 ± 1	32	ml	1	2.5						
							mg	103.22	265.97	1.366	23.432	0.043	0.002	0.030	0.0012
32	Aireación	1000	24	200	23 ± 1	22	ml	20	35						
							mg	2164.72	3792.22	0.809	27.196	0.037	0.002	0.025	0.0011
33	Aireación	1000	24	200	23 ± 1	26	ml	28	35						
							mg	3032.72	3792.22	0.322	80.630	0.012	0.001	0.009	0.0004
34	Aireación	1000	24	200	23 ± 1	28	ml	15	35						
							mg	1622.22	3792.22	1.225	22.853	0.044	0.002	0.030	0.0013
35	Aireación	1000	24	200	23 ± 1	31	ml	25	27						
							mg	2707.22	2924.22	0.1112	78.650	0.004	0.000	0.002	0.0001
36	Aireación	1000	24	200	23 ± 1	34	ml	28	35						
							mg	3032.72	3792.22	0.322	105.439	0.009	0.228	0.007	0.0003
37	Aireación	1000	24	200	23 ± 1	44	ml	15	35						
							mg	1622.22	3792.22	1.225	35.913	0.028	0.557	0.019	0.0008
38	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	17						
						Medio Z8	mg	157.47	1839.22	3.546	13.817	0.072	1.737	0.050	0.0021

Anexo V. Sumario de experimentos de producción de biomasa 134

Sistema	Vol. / Vol.		Fotoperiodo	Intensidad	T° C	t (días)	Unidades	Biomasa		n	tg	K	K	μ	μ	
	mtrz	Z8 <sup>0</sup>						medición	X <sub>0</sub>							X <sub>t</sub>
				μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>					(días <sup>-1</sup> ) (h. <sup>-1</sup> ) (días <sup>-1</sup> ) (horas <sup>-1</sup> )							
39	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	14							
							Medio Z8	mg	157.47	1513.72	3.265	15.006	0.067	0.003	0.046	0.002
40	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	13							
							Medio Z8	mg	157.47	1405.22	3.158	15.516	0.064	0.003	0.045	0.002
41	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	16							
							Medio Z8 <sup>1/2</sup>	mg	157.47	1730.72	3.459	14.168	0.071	0.003	0.049	0.002
42	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	15							
							Medio Z8 <sup>1/2</sup>	mg	157.47	1622.22	3.365	14.561	0.069	0.003	0.048	0.002
43	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	13							
							Medio Z8 <sup>1/2</sup>	mg	157.47	1405.22	3.158	15.516	0.064	0.003	0.045	0.002
44	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	10							
							Medio Z8 <sup>0</sup>	mg	157.47	1079.72	2.778	17.640	0.057	0.002	0.039	0.002
45	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	15							
							Medio Z8 <sup>0</sup>	mg	157.47	1622.22	3.365	14.561	0.069	0.003	0.048	0.002
46	Aireación	1000	12	100	25 ± 1	49	ml	1.5	15							
							Medio Z8 <sup>0</sup>	mg	157.47	1622.22	3.365	14.561	0.069	0.003	0.048	0.002
47	Aireación	2000/1800	24	120	23 ± 1	26	ml	1	18							
								mg	103.22	1947.72	4.238	6.134	0.163	0.007	0.113	0.005
48	Aireación	2000/1800	24	120	23 ± 1	26	ml	1	20							
								mg	103.22	2164.72	4.391	5.921	0.169	0.007	0.117	0.005
49	Aireación	2000/1800	12	90	20 ± 1	15	ml									
								mg	265.80	297.80	0.164	91.453	0.011	0.000	0.008	0.000
50	Aireación	2000/1800	12	90	20 ± 1	15	ml									
								mg	265.80	299.32	0.171	87.533	0.011	0.000	0.008	0.000
51	Aireación	2000/1800	12	100	25 ± 1	28	ml	9.67	14.8							
								mg	1043.91	1600.52	0.617	45.410	0.022	0.001	0.015	0.001
52	Aireación	2000/1800	12	100	25 ± 1	28	ml	11.6	16							
								mg	1253.32	1730.72	0.466	60.129	0.017	0.001	0.012	0.000
53	Aireación	2000	12	100	25 ± 1	28	ml	10.79	12.7							
								mg	1165.43	1372.67	0.236	118.574	0.008	0.000	0.006	0.000
54	Aireación	2000	12	100	25 ± 1	55	ml	5	30							
								mg	537.22	3249.72	2.597	21.178	0.047	0.002	0.033	0.001
55	Aireación	2000	12	100	25 ± 1	55	ml	5	25							
								mg	537.22	2707.22	2.333	23.570	0.042	0.002	0.029	0.001
56	Aireación	2000	12	100	25 ± 1	55	ml	5	23							
								mg	537.22	2490.22	2.213	24.854	0.040	0.002	0.028	0.001

Anexo V. Sumario de experimentos de producción de biomasa 135

Sistema	Vol. /		Fotoperiodo	Intensidad	T° C	t (días)	Unidades	Biomasa		n	tg	K	K	μ	μ
	mtrz	Z <sup>0</sup>						X <sub>0</sub>	X <sub>t</sub>						
57	Aireación	2000	24	200	23 ± 1	53	ml	5	38						
							mg	537.22	4117.72	2.939	18.036	0.055	0.0023	0.038	0.0016
58	Aireación	2000	24	200	23 ± 1	11	ml	35	38						
							mg	3792.22	4117.72	0.119	92.581	0.011	0.0005	0.007	0.0003
59	Aireación	2000	24	200	23 ± 1	11	ml	35	55						
							mg	3792.22	5962.22	0.653	16.849	0.059	0.0025	0.041	0.0017
60	Aireación	2800/2500	24	200	23 ± 1	9	ml	68	75						
							mg	7372.72	8132.22	0.141	63.619	0.016	0.0007	0.011	0.0005
61	Aireación	2800/2500	24	200	23 ± 1	9	ml	66	75						
							mg	7155.72	8132.22	0.185	48.762	0.021	0.0009	0.014	0.0006
62	Aireación	15000	24	175	± 1	25	ml	42	125.7						
							mg	4551.72	13633.17	1.583	15.795	0.063	0.0026	0.044	0.0018
63	Aireación	19000	24	453	23 ± 1	49	ml	5	28						
							mg	537.22	3032.72	2.497	19.621	0.051	0.0021	0.035	0.0015
64	Aireación	19000	24	453	23 ± 1	28	ml	75	228.6						
							mg	8132.22	24797.82	1.609	17.406	0.057	0.0024	0.040	0.0017
65	Aireación	19000	24	500	23 ± 1	28	ml	75	179						
							mg	8132.22	19416.22	1.256	22.299	0.045	0.0019	0.031	0.0013
66	Aireación	19000	24	22	26 ± 1	48	ml	40	61.9						
							mg	4334.72	6710.87	0.631	76.115	0.013	0.0005	0.009	0.0004
67	Aireación	19000	24	29	26 ± 1	48	ml	44	60.8						
							mg	4768.72	6591.52	0.467	102.771	0.010	0.0004	0.007	0.0003
68	Aireación	19000	24	32	26 ± 1	48	ml	44	49.6						
							mg	4768.72	5376.32	0.173	277.402	0.004	0.0002	0.002	0.0001
69	Aireación	19000	24	31	26 ± 1	45	ml	37	36.9						
							mg	4009.22	3998.37	####	#####	0.000	0.0000	0.000	0.0000
70	Aireación	19000	24	22	26 ± 1	45	ml	42	60.3						
							mg	4551.72	6537.27	0.522	86.153	0.012	0.0005	0.008	0.0003
71	Aireación	19000	12	100	25 ± 1	66	ml	45	72						
							mg	4877.22	7806.72	0.679	97.241	0.010	0.0004	0.007	0.0003



**ANEXO VI. DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

**Optimización de la producción de biomasa de *Scytonema***

Cuadro 1.

Diametro de las colonias				Día 24		
1-RECAMBIO, 2-DIAMETRO						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	35.5619431	24	23.5847225	1.50783813	0.241626605
2	3	493.536652	24	23.5847225	20.9261169	6.96315E-07
12	6	36.439724	24	23.5847225	1.54505622	0.206470639

**Efecto de *S. ocellatum* en la retención de humedad en el suelo**

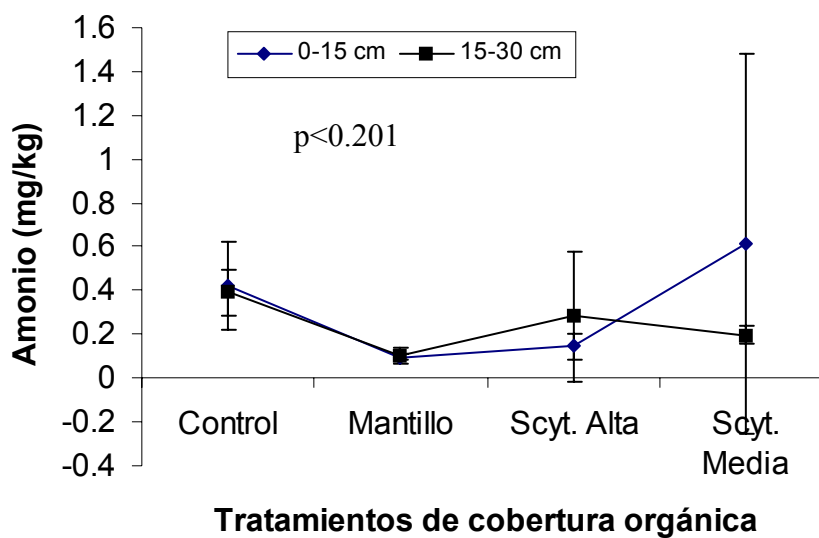
Retención de humedad en Macetas						
Variables contrastadas: Concentración de <i>Scytonema</i> = Control, Baja, Media, Alta						
	df	MS	df	MS		
Día	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
3	3	1.301	8	1.657	0.785	0.535
6	3	2.332	8	1.577	1.479	0.292
9	3	7.964	8	1.858	4.286	0.044
12	3	5.009	8	2.484	2.017	0.190
15	3	0.773	8	0.142	5.442	0.025

Tukey HSD test; variable <b>DIA_9</b> (retención de humedad)			
Homogeneous Groups, alpha=.05			
MAIN EFFECT: Tratamientos Control, Baja, Media, Alta			
		Mean	
C	{1}	14.5601444	xxxx
B	{2}	16.7549324	xxxx xxxx
M	{3}	17.6953316	xxxx xxxx
A	{4}	18.2644558	xxxx

Tukey HSD test; variable <b>DIA_15</b> (retención de humedad)			
Homogeneous Groups, alpha=.05			
MAIN EFFECT:Tratamientos Control, Baja, Media, Alta			
		Mean	
			1 2
C	{1}	6.96030951	xxxx
M	{3}	6.97950745	xxxx
B	{2}	7.1645546	xxxx xxxx
A	{4}	8.03309441	xxxx

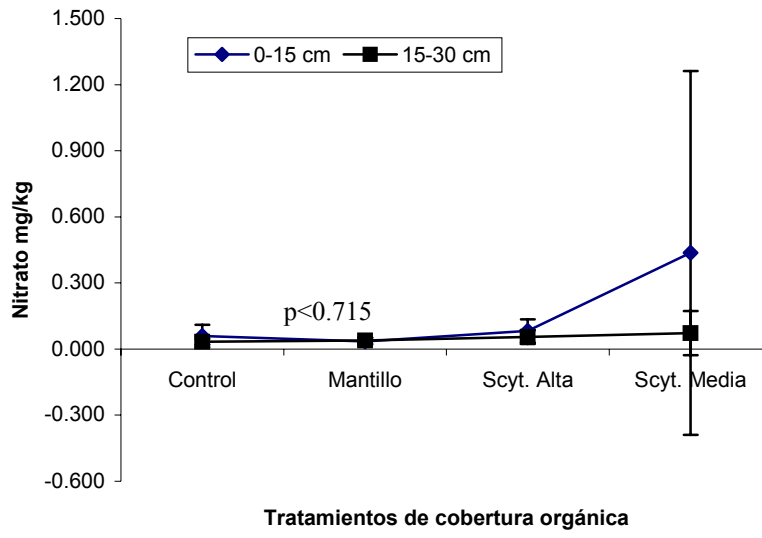
Contenido de amonio en el suelo del campo agrícola

			Profundidad	
			0-15 cm	15-30 cm
	Tratamiento	Repeticion	N-NH4 mg/kg	N-NH4 mg/kg
Control	I	A	0.33	0.39
Control	I	B	0.57	0.37
Control	I	C	0.6	0.53
Control	I	D	0.18	0.28
Mantillo	II	A	0.09	0.06
Mantillo	II	B	0.08	0.14
Mantillo	II	C	0.1	0.09
Mantillo	II	D	0.12	0.13
Scyt alta	III	A	0.1	0.15
Scyt alta	III	B	0.22	0.72
Scyt alta	III	C	0.17	0.07
Scyt alta	III	D	0.10	0.19
Scyt media	IV	A	0.14	0.21
Scyt media	IV	B	1.92	0.16
Scyt media	IV	C	0.20	0.17
Scyt media	IV	D	0.20	0.25



Contenido de nitrato en el suelo del campo agrícola

Cobertura	Tratamiento	Repeticion	Profundidad	
			0-15 cm N-NO3 mg/kg	15-30 cm N-NO3 mg/kg
Control	I	A	0.000	0.029
Control	I	B	0.052	0.030
Control	I	C	0.123	0.022
Control	I	D	0.061	0.052
Mantillo	II	A	0.024	0.044
Mantillo	II	B	0.021	0.033
Mantillo	II	C	0.054	0.023
Mantillo	II	D	0.041	0.054
Scyt alta	III	A	0.116	0.023
Scyt alta	III	B	0.034	0.099
Scyt alta	III	C	0.138	0.050
Scyt alta	III	D	0.042	0.050
Scyt media	IV	A	0.055	0.188
Scyt media	IV	B	1.675	0.001
Scyt media	IV	C	0.008	
Scyt media	IV	D	0.009	0.030



### Valoración Agrobiológica

Clorofila Total ( $\mu\text{g/mL}$ ) de las hojas de chile ancho						
	Sin Aplicación	1 Aplic Plántula (1.14 mg/mL)	1 Aplica Floración (0.22 mg/mL)	1 Aplic Floración (5.4 mg/mL)	3 Aplic Plántula (0.24 mg/mL)	2 Aplic Floración (0.14mg/mL)
	C1	C5	C3	C6	C4	C2
<b>A 1 Sustrato Sunshine + B1 Fertilizante</b>	2.257	1.511	2.250	2.016	2.046	2.386
	2.286	1.579	1.963	1.634	2.197	2.803
	2.427	1.326	2.714	2.527	2.427	2.156
<b>A 2 Sustrato Mixto + B1 Fertilizante</b>	1.650	1.466	1.515	2.369	1.710	2.484
	1.469	2.776	2.179	1.913	1.942	1.807
	1.358	2.907	1.847	2.033	1.530	2.146
<b>A 1 Sustrato Sunshine + B2 Agua</b>	1.309	1.365	1.345	0.957	1.120	1.122
	1.273	1.199	1.116	1.237	1.139	1.109
	1.262	1.237	1.073	1.422	1.376	1.203
<b>A 2 Sustrato Mixto + B2 Agua</b>	0.650	0.627	0.579	0.500 *	0.662	1.052
	0.561	1.102	0.530	0.645 *	0.709	0.868
	0.572	0.890	0.653	0.706 *	0.777	0.710

\* 2 aplicaciones de 1622.22 mg de *Scytonema* a partir de la etapa de floración

<b>Análisis multifactorial de Clorofila total (mg/mL) en hojas de chile</b>						
1-SUSTRATO, 2-RIEGO, 3-APLICACIONES						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	1	1.903	48	0.073	26.050	5.652 E-06
2	1	20.244	48	0.073	277.105	1.423 E-21
3	5	0.080	48	0.073	1.097	0.374
1 2	1	0.334	48	0.073	4.570	0.038
1 3	5	0.380	48	0.073	5.198	0.001
2 3	5	0.073	48	0.073	0.995	0.431
1 2 3	5	0.216	48	0.073	2.956	0.021

<b>Análisis monofactorial de Clorofila total en hojas de chile</b>						
Combinación de sustrato-riego						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
SunFert	5	0.370	12	0.086	4.315	0.018
SunAgua	5	0.008	12	0.018	0.454	0.803
MixFert	5	0.312	12	0.163	1.909	0.166
MixAgua	5	0.059	12	0.025	2.323	0.108

<b>Proteína Total (%) de los frutos de chile ancho</b>						
	Sin Aplicación (1.14 mg/mL)	1 Aplic Plántula (0.22 mg/mL)	1 Aplica Floración (0.22 mg/mL)	1 Aplic Floración (5.4 mg/mL)	3 Aplic Plántula (0.24 mg/mL)	2 Aplic Floración (0.14mg/mL)
	<b>C1</b>	<b>C5</b>	<b>C3</b>	<b>C6</b>	<b>C4</b>	<b>C2</b>
<b>A 1 Sustrato Sunshine + B1 Fertilizante</b>	11.860	11.530	10.002	11.374	12.343	14.026
	11.983	11.733	9.740	11.383	12.322	13.476
	11.884	11.687	9.998	11.441	11.935	13.729
<b>A 2 Sustrato Mixto + B1 Fertilizante</b>	8.532	12.796	12.201	15.044	14.824	12.189
	8.562	13.090	12.191	15.044	15.029	12.189
	15.094	12.942	11.931	8.423	12.226	8.571
<b>A 1 Sustrato Sunshine + B2 Agua</b>	8.725	8.423	10.317	10.393	13.169	8.941
	8.722	8.454	10.553	10.453	13.365	11.180
	8.632	8.419	10.383	10.553	13.248	11.246
<b>A 2 Sustrato Mixto + B2 Agua</b>	12.501	18.338	16.701	17.212*	19.295	10.237
	12.623	18.220	16.580	17.212*	18.318	10.118
	12.392	ND	16.545	ND	ND	10.323

\* 2 aplicaciones de 1622.22 mg de *Scytonema* a partir de la etapa de floración

Porcentaje de Proteína en Frutos de Chile						
1-SUSTRATO, 2-APLICACIONES de <i>Scytonema</i>						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	3	90.4928436	48	1.58128405	57.2274475	6.99574E-16
2	5	20.1160259	48	1.58128405	12.7213249	6.88894E-08
1 2	15	11.3014126	48	1.58128405	7.14698458	7.56409E-08

Porcentaje de Proteína en Frutos de Chile						
Sustrato Sunshine con fertilizante, 6 aplicaciones de <i>Scytonema</i>						
	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	5	4.61513281	12	0.02797087	164.997833	1.2501E-10

Tukey HSD test; variable PROTEINA (clorof~1.sta)						
Homogeneous Groups, alpha=.05						
Sustrato Sunshine con fertilizante, 6 aplicaciones de <i>Scytonema</i>						
	Mean	1	2	3	4	5
S1A3 {3}	9.91333485	xxxx				
S1A4 {4}	11.3993063		xxxx			
S1A2 {2}	11.6500483		xxxx	xxxx		
S1A1 {1}	11.9090147			xxxx	xxxx	
S1A5 {5}	12.1999693				xxxx	
S1A6 {6}	13.7435846					xxxx



<b>Prueba estadística de comparación de medias Tukey</b>				
<b>Variable: PROTEINA (%) en frutos de chile</b>				
Homogeneous Groups, alpha=.05				
MAIN EFFECT: Sustrato Sunshine regado con agua + aplicaciones de <i>Scytonema</i>				
		Mean	1	2
				3
S3 A2	{2}	8.43178844	xxxx	
S3 A1	{1}	8.69300461	xxxx	
S3 A3	{3}	10.4179144		xxxx
S3 A6	{6}	10.4554195		xxxx
S3 A4	{4}	10.4664898		xxxx
S3 A5	{5}	13.2605009		xxxx

<b>Longitud de los frutos de chile</b>				
Probabilities for Post Hoc Tests; Tukey HSD test				
MAIN EFFECT: Combinación Sustrato-Riego				
	{1}	{2}	{3}	{4}
Promedio	10.35056	10.13893	8.601666	3.981429
SunFert {1}		0.93367302	2.6762E-05	7.689E-06
SunAgua {2}	0.93367302		0.00304776	7.689E-06
MixFert {3}	2.6762E-05	0.00304776		7.689E-06
MixAgua {4}	7.689E-06	7.689E-06	7.689E-06	

<b>Peso fresco de los frutos de chile</b>				
Probabilities for Post Hoc Tests; Tukey HSD test				
MAIN EFFECT: Combinación Sustrato-Riego				
	{1}	{2}	{3}	{4}
Promedios	4.748750	3.890714	3.082917	.5553333
SunFert {1}		0.03818029	1.3113E-05	7.689E-06
SunAgua {2}	0.03818029		0.18364877	7.689E-06
MixFert {3}	1.3113E-05	0.18364877		8.285E-06
MixAgua {4}	7.689E-06	7.689E-06	8.285E-06	

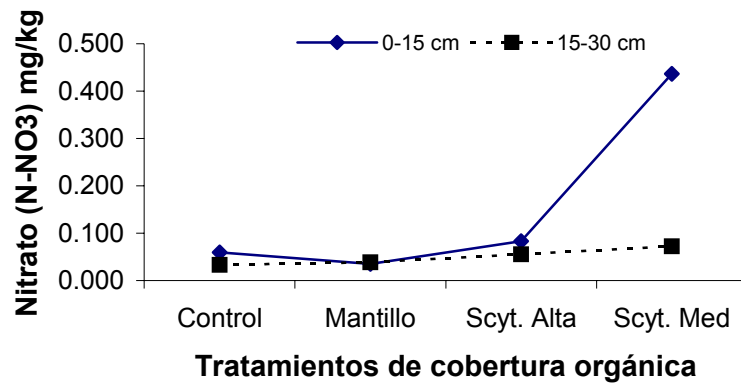


Figura 24. Contenido de nitrato en suelo a dos profundidades, con tratamientos de cobertura orgánica.

Propuestas de Artículos

**Cyanobacteria *Scytonema ocellatum* as an enhancement nitrogen content in chili peppers (*Capsicum annum L.*)**

López Cortés, A., Alvarez González, A., Larrinaga, J. y Troyo Diéguez, E.

Resumen

La cianobacteria *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 fue aplicada en diferentes proporciones y tiempos en un cultivo de chiles en macetas. Los chiles se cultivaron en dos tipos de sustrato: 100% orgánico y una mezcla de 30% sustrato orgánico mas 70% suelo franco arenoso; y fueron regados con fertilizante Hoagland al 50% o con agua. Los tratamientos con *S. ocellatum* no presentaron diferencias significativas con respecto al control en la longitud y peso de los frutos de chile, sin embargo, en el porcentaje de proteínas los tratamientos con esta cianobacteria fueron diferentes del control, especialmente cuando se aplicó a partir de la etapa de plántula. En cuanto al sustrato y riego, la longitud y peso de los frutos de chile fueron significativamente más grandes en los tratamientos con sustrato 100% orgánico, tanto regados con fertilizante como con agua. Sin embargo, el mayor porcentaje de proteína se presentó en los tratamientos con sustrato mixto, especialmente cuando se regó con agua. Estos resultados sugieren a *Scytonema ocellatum* como una opción de biofertilizante que mejora la calidad de los frutos de chile en suelos pobres de materia orgánica y nitrógeno, como lo son la mayoría de los suelos de las zonas semiáridas.

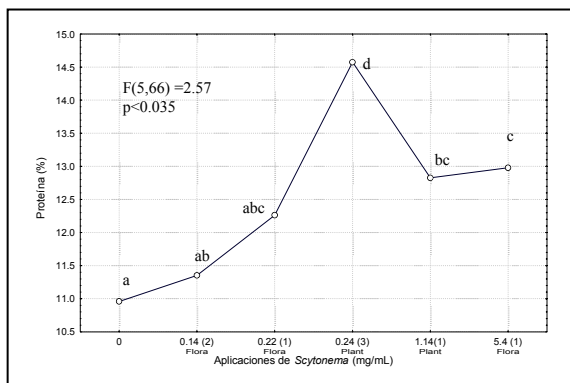


Figura 21. Efecto de la concentración de *Scytonema* en el porcentaje de proteína de frutos de chile crecidos en 2 tipos de sustrato (Sunshine y Mixto) y riego (Fertilizante y Agua). Entre paréntesis se indica el número de aplicaciones y debajo la etapa de la planta en que fue aplicada (Flora: Floración; Plant: Plántula). Las letras indican medias diferentes por la prueba de Tukey.

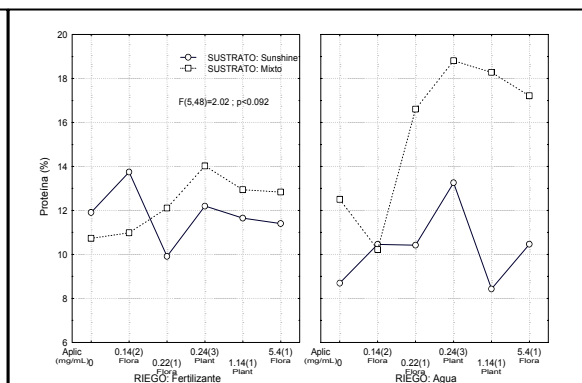


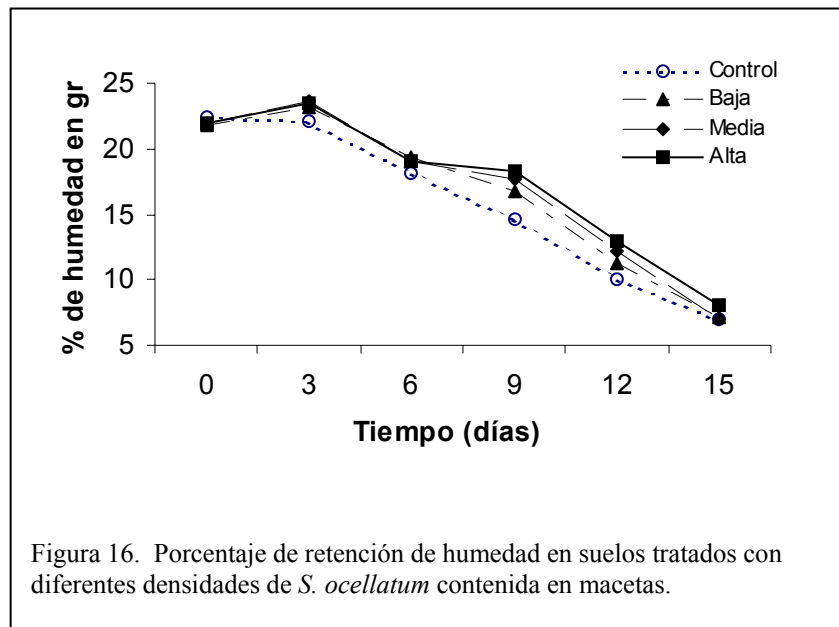
Figura 24. Efecto de la interacción de las variables riego (Fertilizante y Agua), sustrato (Sunshine y Mixto) y aplicación de *Scytonema* (mg/mL) en el porcentaje de proteína en los frutos de chile. Entre paréntesis se indica el número de aplicaciones y debajo se indica la etapa de aplicación.

## Cyanobacteria *Scytonema* as a soil moisture retain

López Cortés, A., Alvarez González, A., Troyo Diéguez, E. y Maya Delgado, Y.

### Resumen

Se cubrió con 3 diferentes concentraciones de biomasa de *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 el suelo contenido en macetas dentro de una casa sombra. Aparte, se realizó un experimento en el campo comparando la cobertura del suelo con mantillo de frijol gandul y 2 concentraciones de biomasa de *S. ocellatum*. El experimento en macetas se realizó en diciembre del 2002 y se observó que el tratamiento con mayor cobertura de *S. ocellatum* retuvo a los 12 días 17.6% más humedad que el control y a los 15 días el 25%. El experimento en campo se realizó en junio del 2003 y no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con cobertura y el control, suponemos que fue debido a las condiciones climáticas que se presentaron en ese tiempo. De acuerdo a estos resultados, se considera que la cianobacteria *S. ocellatum* podría funcionar como un retenedor de humedad en los cultivos de otoño, invierno y primavera o cuando la temperatura no exceda los 30°C y la humedad relativa no sea menor a 60%.



## Optimization of biomass production of *Scytonema ocellatum* to agricultural purposes.

López Cortés, A., Alvarez González, A.

### Resumen

Se inoculó *Scytonema ocellatum* cepa SLC1097-22 bajo diferentes sistemas de incubación, temperatura, luz y recambio de medio. Las velocidades de crecimiento mas altas se lograron con la combinación de 23 °C, 24 horas de luz, intensidad de luz de  $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 10 % de recambio de medio de cultivo en sistema de aireación. Para medir la biomasa de las colonias se empleó una técnica modificada de volumen celular empaquetado ya que el crecimiento colonial de *S. ocellatum* dificulta la medición por otros métodos. Las colonias entre 1 y 2 mm de diámetro resultaron ser las mejores para escalar la producción de biomasa. El mejor momento de cosecha de biomasa es alrededor de 26 días. La máxima concentración de biomasa que se logró obtener fue de 3.8 g/L en un contenedor de 1 L, suponemos que en biorreactores de mayor volumen se podrá incrementar la densidad del cultivo.

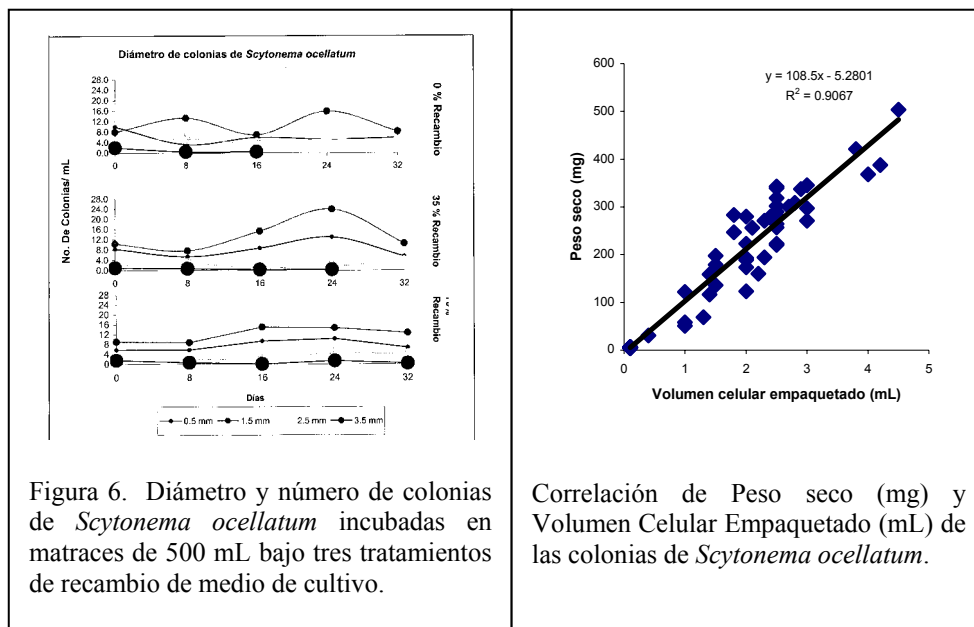


Figura 6. Diámetro y número de colonias de *Scytonema ocellatum* incubadas en matraces de 500 mL bajo tres tratamientos de recambio de medio de cultivo.

Correlación de Peso seco (mg) y Volumen Celular Empaquetado (mL) de las colonias de *Scytonema ocellatum*.

Tabla IV. Dos sistemas de cultivo: agitación y aireación.

Sistema de Cultivo	Vol. Biorreactor (L)	Recambio (%)	tg (días ± d.e.)	K (días <sup>-1</sup> ± d.e.)
Agitación	0.5	70	21.9 ± 8.88	0.041 ± 0.01
Aireación	1.0	10	14.7 ± 0.68	0.065 ± 0.01
	2.0	10	23.3 ± 1.87	0.041 ± 0.003

Condiciones de cultivo: temperatura 25±1 °C, intensidad de luz 100 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, fotoperiodo 12/12 horas. Tiempo de generación (tg), velocidad de crecimiento poblacional (K), porcentaje de recambio del medio de cultivo Z8<sup>0</sup> (Recambio %), desviación estándar (d.e.).

Tabla V. Condiciones de incubación de cultivos de *Scytonema ocellatum*.

Condiciones de Incubación	T °C	Foto periodo	Intensidad de Luz (μEm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	tg (días ± d.e.)	K (días <sup>-1</sup> ± d.e.)	Biomasa final (g)
1	20	12/12	90	85.25 ± 7.17	0.012 ± 0.02	1.23
2	23	24	200	6.08 ± 0.15	0.166 ± 0.14	2.06
3	25	12/12	100	52.89 ± 10.4	0.019 ± 0.09	1.67

Tiempo de generación (tg), velocidad de crecimiento poblacional (K), desviación estándar (d.e.).

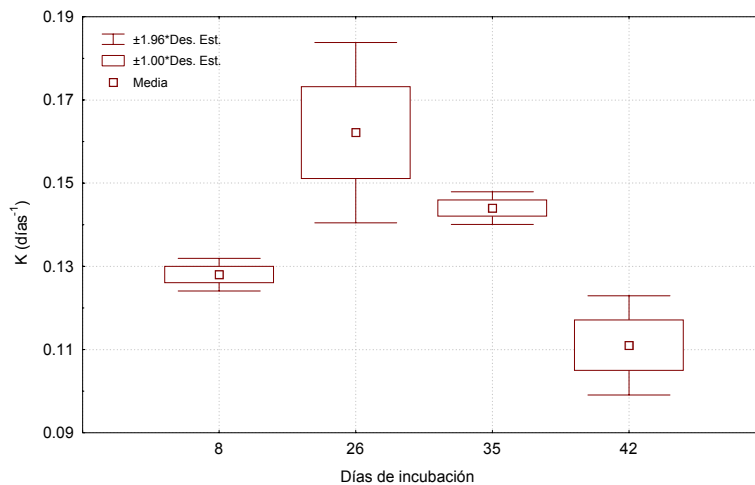


Figura 9. Velocidad de crecimiento poblacional (K) de *S. ocellatum* en 4 tiempos de incubación. Cultivos en matraces de volúmenes menores a 500 mL con medio de cultivo Z8<sup>0</sup>, 24 horas de luz, intensidad de luz 200 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, aireación constante y temperatura de 23±1°C.