

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CULTIVO DE MICROALGAS
PROVENIENTES DE LÍQUENES DEL DESIERTO DE LA JOYA”.**

Tesis Presentada por el Bachiller:
Díaz Cárdenas, Fernando Mario
para optar el título profesional de:
Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:
Mgtr. Bardales Álvarez, Roxana
Margarita

AREQUIPA – PERÚ
2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°.20180000024057

N° Trámite en Fac. 387-2018
Fecha Recep. Fac. 22-05-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **DIAZ CARDENAS, Fernando Mario**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CULTIVO DE MICRO ALGAS PROVENIENTES DE LIQUENES DEL DESIERTO DE LA JOYA"

DICTAMINADORES: **Dr. Julio César Bernabé Ortiz 2) Mgter. Jeaneth Medina Pérez**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES DEL TALO Y CULTIVO DEL FOTOBIONTE PROVENIENTE DE LIQUENES DEL DESIERTO DE LA JOYA"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad. Atentamente

FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **22/05/18**

ASESOR: **Mgter. Roxana Bardales Álvarez**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CULTIVO DE MICROALGAS PROVENIENTES DE LIQUENES DEL DESIERTO DE LA JOYA"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad. Atentamente

FIRMA  FECHA **16/05/19**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. Julio Cesar Bernabé Ortiz**
- 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**
- 3) **Mgter. Jeaneth Medina Pérez**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad. Atentamente

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE **DR. JULIO CESAR BERNABE ORTIZ**
VOCAL **MAG. JAI ME BARREDA DEL CARPIO**
SECRETARIO **MAG. JEANETH MEDINA PEREZ**

FECHA **27/6/19** HORA **19.00** LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO

FECHA



DEDICATORIA

A Dios por haberme puesto en el lugar correcto, habiendo encontrado en el camino a las personas correctas para poder vencer cada una de las adversidades con las que me encontré, las cuales me hicieron llegar hasta este punto, haciéndome lo suficientemente fuerte para superar cada uno de los pasos que di, hasta lograr alcanzar las metas más importantes.

A mis padres por el apoyo incondicional para poder conseguir cada una de las metas que me propuse tratando de entender a su manera las metas que en el camino me propuse.

Especialmente a mi madre que dio cada uno de sus días por que todo lo que hiciera fuera lo mejor para mí y lo que mejor me hiciera sentir, dejando de lado muchas veces su propio confort con tal de que yo pudiera alcanzar cualquier meta que me propusiera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por darme la perseverancia para nunca rendirme, para lograr cada objetivo planteado y haberme llenado de tanto privilegio, así como haberme enseñado siempre que lo más importante es tratar de no perjudicar a nadie y buscar el bien común.

A mis padres Fernando Rolando Díaz Gallegos y María Victoria Cárdenas Velarde, que fueron la guía más grande que dieron rumbo a mi vida en cada instante, eligiendo correctamente cada peldaño.

A mi hermana Angélica Victoria Díaz Cárdenas por apoyarme y acompañarme en cada objetivo planteado por más insensato que pareciera.

A las personas que siempre me apoyaron y que estuvieron conmigo tanto en mis alegrías como en mis derrotas siendo el apoyo moral que toda persona necesita.

Al doctor Saúl Pérez Montaña porque gracias a él, a sus enseñanzas y su guía pude realizar este trabajo de investigación.

Al biólogo Avelino Yapo Pari por su ayuda y confianza para realizar este trabajo.

A Brigitte Guizela Aguilar Moron por haberme ayudado con tanta paciencia, alegría e incentivo a terminar esta investigación incluso cuando las circunstancias se volvían adversas.

Y a todos aquellos verdaderos amigos que me dieron su apoyo en los peores momentos para no rendirme y seguir adelante en cualquier circunstancia.

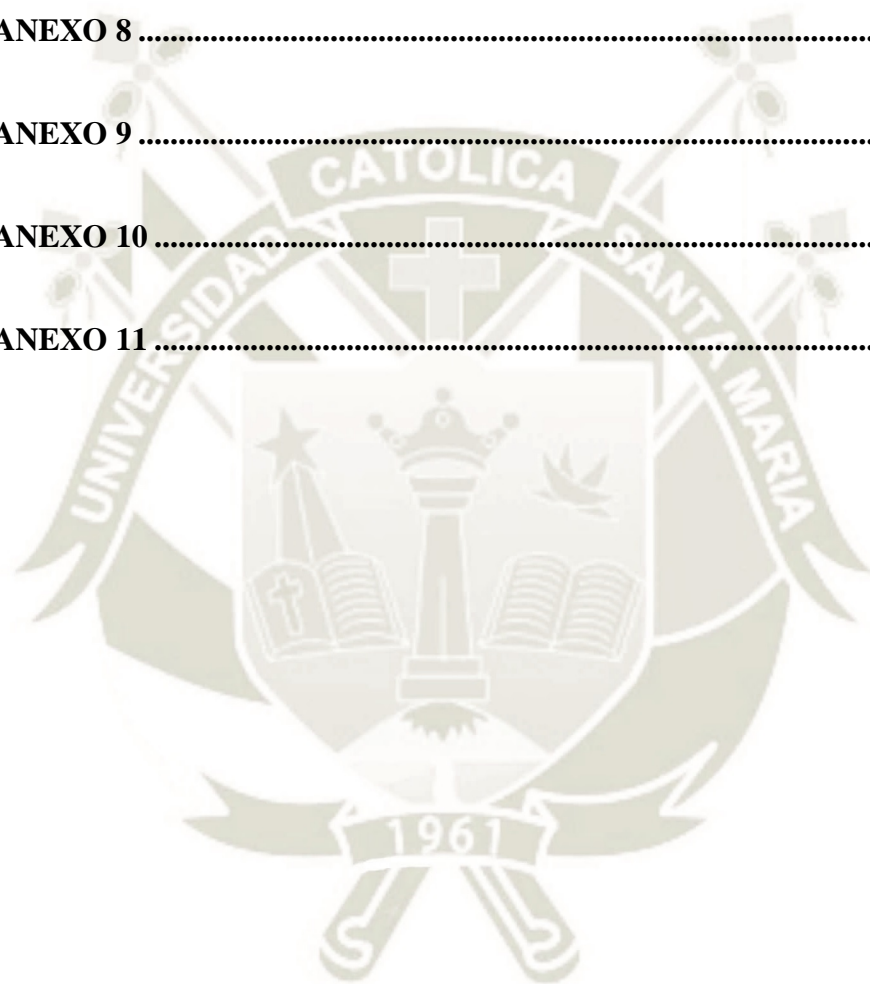
ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
HIPÓTESIS	XVI
OBJETIVOS.....	XVII
Objetivo general	xvii
Objetivos específicos	xvii
CAPÍTULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. LÍQUENES:.....	1
1.1.1. Naturaleza De Los Líquenes.....	1
1.1.2. Diferenciación De Los Líquenes	2
1.1.3. Líquenes En Atacama	3
1.1.4. Características De Los Líquenes.....	5
1.2 EL DESIERTO DE ATACAMA	9
1.3 MICROALGAS.....	11

1.3.1 Clasificación De Las Microalgas	11
1.3.2 Cultivo De Microalgas.....	12
1.3.3 Importancia De Las Microalgas.....	14
1.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	15
1.4.1 Extracción De Adn.....	15
1.5 EL EDS ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA	16
1.5.1. Principios:	17
CAPÍTULO II.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1. MATERIALES	19
2.1.1. Vidrio.....	19
2.1.2. Otros.....	19
2.1.3. Equipos De Laboratorio.....	21
2.1.4. Reactivos.....	22
2.2. MÉTODOS	24
2.2.1. Área De Estudio Y Colecta.....	25
2.2.2. Identificación Del Liquen Y Sus Componentes	29
2.2.3 Identificación Macroscópica.....	30
2.2.4 Identificación Molecular.....	32
2.2.5 Cultivo Del Fotobionte En Medios Nutritivos.....	33
2.2.6 Evaluación De Los Tratamientos.....	41
CAPÍTULO III.....	44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44

3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL MICOBIONTE.....	44
3.2 AISLAMIENTO DEL FOTOBIONTE.....	45
3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	45
3.3.1 Identificación Molecular De Los Micobiontes	45
3.3.2 Identificación Molecular Del Fotobionte.....	49
3.4 ANÁLISIS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE ENERGIA DE RAYOS X (EDS) PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ARTIFICIALES A USAR.	53
3.5 OBTENCIÓN DE BIOMASA EN 3 MEDIOS DE CULTIVO ARTIFICIALES A 2 FOTOPERIODOS.....	55
3.5.1 Fotoperiodo 12 Horas	55
3.5.2 Fotoperiodo 24 Horas	59
3.6 COMPARACIÓN DE RESULTADOS.....	65
CAPÍTULO IV	68
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
4.1. CONCLUSIONES.....	68
4.2. RECOMENDACIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXOS	78
ANEXO 1	78
ANEXO 2	79
ANEXO 3	80

ANEXO 4	81
ANEXO 5	82
ANEXO 6	83
ANEXO 7	85
ANEXO 8	86
ANEXO 9	89
ANEXO 10	90
ANEXO 11	91



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Procedimiento del método Sanger ⁽²⁷⁾	16
Figura 2: Diseño referencial del espectro utilizado para el análisis EDS.	17
Figura 3: Imagen referencial de los picos de escape que se presentan.	18
Figura 4: Imagen referencial de los picos que se pueden mostrar en la lectura del espectro.	18
Figura 5: Flujograma de las operaciones unitarias representativas del aislamiento, identificación molecular de los componentes del talo liquénico y cultivo del fotobionte recolectado en el desierto de la Joya.	24
Figura 6: Área de colecta de muestras determinada como “Mar de Cuarzo” según el estudio de Valdivia Silva ⁽⁹⁾ ubicada en el desierto de la Joya.	26
Figura 7: Mapa de muestreo del área de interés denominada “Mar de Cuarzo” ubicada en por el programa Google Earth Pro.	27
Figura 8: Descripción de la forma de recolección de la muestra de líquen en tubos con perlas de sílica y algodón.	28
Figura 9: Extracción del líquen de la matriz rocosa para su identificación macroscópica y aislamiento.	29
Figura 10: A) Hongo negro en medio solido PDA B) Hongo negro y hongo blanco en medio PDA.	30
Figura 11: A) Plataforma utilizada para realizar el BLAST de la secuencia recibida. B) BLAST realizado a la muestra con sus homólogos. C) Programa Mega7 utilizado para el alineamiento y diseño del árbol genealógico de la muestra. D) Alineamiento de las secuencias para el diseño del árbol filogenético.	33
Figura 12: A) Tratamiento con Rifampicina, Cloranfenicol y Penicilina y sin Rifampicina a la concentración de 3.0ml. B) Tratamiento con Rifampicina cloranfenicol y Penicilina, y sin Rifampicina en las cantidades de 2.0, 1.0 y 0.5 mL. Ambas se realizaron por triplicado.	35
Figura 13: A) Preparación de los stocks para los diferentes medios de cultivo. B) Medio de cultivo preparado	37
Figura 14: A) Perforación de las tapas para que puedan entrar los corchos. B) Corte de las varillas de vidrio. C) Pulido de las varillas de vidrio para evitar cortes.	38

Figura 15: Reactores armados y auto clavados.....	38
Figura 16: A) Imagen de la preparación de los materiales para el inoculado. B) La materia madre posteriormente tratada para utilizarla como inóculos. C) Los reactores después de haber sido rotulados e inoculados.....	39
Figura 17: A) Reactor de 24 horas armado y puesto en funcionamiento. B) Reactores de 12 horas puestos en funcionamiento.	40
Figura 18: A) Inoculación de los medios de cultivo en la cámara de flujo laminar de la tercera repetición de los reactores. B) Reactores de fotoperiodo de 12h en funcionamiento. C) Reactores de fotoperiodo de 24h en funcionamiento.....	41
Figura 19: Curva de calibración de la especie aislada de la Joya	42
Figura 20: Curva de calibración de la especie comparativa <i>Chlorella</i> sp	43
Figura 21: A) Hongo claro aislado del líquen, sembrado en un tubo con agar PDA. B) Tubo con la especie de hongo oscuro aislada en agar PDA proveniente del líquen. C) Hongo claro extraído del líquen observado al microscopio a 40x. D) Hongo oscuro extraído del líquen observado al microscopio a 40x	44
Figura 22: A) Resultado del análisis mediante BLAST de la secuencia de hongo negro. B) Resultado BLAST de la secuencia de hongo claro.	45
Figura 23: Árbol filogenético de la especie de hongo negro <i>Neocatenulostroma</i> diseñada en el programa Mega 7.....	47
Figura 24: Árbol filogenético de la especie de hongo claro <i>Acarospora</i> cf. <i>Bullata</i>	49
Figura 25: A) Analisis BLAST del fotobionte de la Joya con el marcador ITS1. B) Analisis BLAST del fotobionte de la Joya con el marcador ITS4.....	51
Figura 26: Árbol filogenético de la secuencia analizada con el marcador ITS1 en el programa Mega 7.	52
Figura 27: Árbol filogenético analizado con el marcador ITS4 en el programa Mega7.....	52
Figura 28: A) Gráfico del análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) B) Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS).	54
Figura 29: Curva de crecimiento en medios artificiales de la especie nueva <i>Chloridium</i> de la Joya en el fotoperiodo de 12 horas.....	57
Figura 30: Curva de crecimiento de la especie <i>Chlorella</i> sp. en medios BBM, BG-11 y F/2 en el fotoperiodo de 12 horas.....	58

Figura 31: Curva de crecimiento del alga de la Joya Chloridium en medios artificiales en el fotoperiodo de 24 horas luz. 60

Figura 32: Curva de crecimiento del alga Chlorella en medios artificiales en el fotoperiodo de 24 horas..... 61



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración promedio en medios de cultivo artificial del alga de la Joya Chloridium con fotoperiodo de 12 horas.....	56
Tabla 2: Concentración promedio en medio de cultivo artificial del alga Chlorella con fotoperiodo de 12 horas.....	57
Tabla 3: Concentración promedio en medios de cultivo artificial del alga de la Joya Chloridium con fotoperiodo de 24 horas.	59
Tabla 4: Concentración promedio en medio F/2 del alga Chlorella con fotoperiodo de 24 horas.....	61
Tabla 5: Análisis estadístico comparativo entre los medios de cultivo, en el fotoperiodo de 12 horas para el alga Chloridium en investigación, mediante un análisis Anova Multivaria1ble con análisis Tukey.....	64
Tabla 6: Análisis estadístico comparativo entre los medios de cultivo, en el fotoperiodo de 24 horas para el alga Chloridium en investigación, mediante un análisis Anova Multivaria1ble con análisis Tukey.....	65
Tabla 7: Tabla de promedios de crecimiento en cel/mL. En tres medios de cultivo diferentes, a dos fotoperiodos de luz, de las especies Chloridium de la Joya y Chlorella.....	66
Tabla 8: Anexo 1 tabla de data Cruda.....	78
Tabla 9: Anexo 2 tabla de data Cruda.....	79
Tabla 10: Anexo 3 tabla de data Cruda.....	80
Tabla 11: Anexo 4 tabla de data Cruda.....	81
Tabla 12: Anexo 5 Medio de cultivo BG-11	82
Tabla 13: Anexo 5 traza de metales.....	83
Tabla 14: Anexo 6 Medio de cultivo BBM	84
Tabla 15: Anexo 6 solucion de Metales	84
Tabla 16: Anexo 7 Medio de Cultivo F/2	85
Tabla 17: Anexo 7 Trazas de Metales	86
Tabla 18: Anexo 8 Medio de Cultivo Trebouxia	86
Tabla 19: Anexo 8 Medio Bristol	87
Tabla 20: Anexo 8 Solucion Agua/Suelo	88

RESUMEN

Los líquenes están formados por la simbiosis desarrollada entre uno o más hongos o micobiontes y una o más especies fotosintéticas que aportando entre ambos protección y medios de nutrición para la simbiosis, logran en muchos casos sobrevivir a condiciones extremas que muchos otros organismos no podrían soportar. Existen escasos estudios en los cuales se haya reportado especies liquénicas extremófilas en el desierto hiper árido de la Joya, perteneciente al desierto de Atacama. En este estudio se han encontrado líquenes endolíticos y epilíticos vagamente estudiados, los cuales fueron recolectados, en la zona denominada como el “Mar de Cuarzos”; aislados, y cultivados. El desierto de la Joya es actualmente considerado uno de los lugares con mayores condiciones de hiper-aridez, cuyas cantidades de radiación son muy altas, de 408 Wm^{-2} , con niveles máximos de 1060 Wm^{-2} en los días más secos; cambios bruscos de temperatura entre el día y la noche con máximas de $35.9 \text{ }^\circ\text{C}$ y temperaturas mínimas de $-4 \text{ }^\circ\text{C}$, además de una cantidad muy baja de precipitaciones y humedad aproximados a un 30 % de humedad en el suelo, y variaciones muy notorias en la composición del suelo los cuales dificultan la supervivencia de material biológico en esta zona. Luego del aislamiento y purificación del cultivo se realizó la extracción y secuenciación de ADN de las especies que conforman el talo liquénico, identificándose dos especies de hongos, *Neocatenulostroma microsporum* y *Acarospora cf. Bullata*; ambas especies con un 95 % de homología las cuales se reportan como nuevas especies, y una especie de fotobionte *Chloridium* con un 99% de homólogos, con el estudio filogenético se demostró que no existía un registro anterior de éstas. Se determinó que es posible lograr el desarrollo artificial del fotobionte probando diferentes medios de cultivo para su crecimiento exponencial a dos fotoperiodos de luz diferentes.

Palabras clave: simbiosis, líquenes, extremófilos, fotobiontes, micobiontes.

ABSTRACT

The lichens are constituted by a symbiosis developed between one or more fungal or micobiontic species, and one or more photosinthetic species that help each other; the fungal part giving protection, and the phtotosinthech part providing the nutrients; managing to achieve to survive in extreme conditions. There are few studies that report the existence of extreme lichen species in the “la Joya” hipper arid desert, which is a part of the Atacama’s desert; considered as a Martian analogue because of its conditions of hyper arity in wich the quantity of radiation are extreme with minimum values of 408 Wm^2 and maximum values of 1060 Wm^2 on the driest days, and temperature shocks from the day to the night with maximum values of $35.9 \text{ }^\circ\text{C}$ and minimum values of $-4 \text{ }^\circ\text{C}$, and very low humidity with an average of 30 % of humidity in the ground, and a very variety in the composition of the soil that makes that the biological mater is very low in this zone. In this investigation we found endolithic and epilithic lichens with very few studies, wich were collected in this zone, named as the “Mar de cuarzos”, and later isolated and cultivated. In addition to the isolating and purification of the species in culture media, a molecular identification was made, getting two species of micobionts: one of them named *Neocatenulostroma microsporum* and the other named *Acarospora cf. bullata*; both of them with a 95 % of homology which shows that are new species not studied, and the photobiont of the Chloridium species with an 99 % of homology. This finding determined that is possible the artificial reproduction of the photobiont trying in different artificial culture media, in two different periods of light.

Keywords: symbiosis, lichens, extremophiles, fotobionts, micobionts.