



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: ALMEIDA PORTERO MÓNICA ELIZABETH

**TEMA: EVALUACIÓN COMO ACONDICIONADOR DE SUELO Y A
NIVEL DE LABORATORIO, DE UN CONSORCIO PREVIAMENTE
SELECCIONADO DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS CON
PREDOMINIO DE *Calothrix* sp.**

DIRECTOR: Dr. MORALES, EVER PhD.

CODIRECTORA: Dra. DUCHICELA, JESSICA PhD.

SANGOLQUÍ, MAYO 2014

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo titulado “Evaluación como acondicionador de suelo y a nivel de laboratorio, de un consorcio previamente seleccionado de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix* sp.”; fue realizado en su totalidad por la Srta. MÓNICA ELIZABETH ALMEIDA PORTERO como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

Sangolquí, mayo de 2014

Dr. Ever Morales Avendaño

DIRECTOR

Ing. Jessica Duchicela Escobar, Ph.D.

CODIRECTORA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Mónica Elizabeth Almeida Portero

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Evaluación como acondicionador de suelo y a nivel de laboratorio, de un consorcio previamente seleccionado de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix* sp.”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas al pie de página correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, mayo del 2014

Mónica Elizabeth Almeida Portero

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, Mónica Elizabeth Almeida Portero

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Evaluación como acondicionador de suelo y a nivel de laboratorio, de un consorcio previamente seleccionado de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix* sp.”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, mayo del 2014

Mónica Elizabeth Almeida Portero

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Mónica Elizabeth Almeida Portero

DIRECTORA DE LA CARRERA

Dra. María Augusta Chávez

Sangolquí, mayo del 2014

DEDICATORIA

Con todo mi cariño para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme, apoyarme, enseñarme con su ejemplo y exigirme ser valiente y luchar, darme la mano y estar siempre conmigo cerca o lejos, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Mary, Cristian y Santiago

AGRADECIMIENTO

Mi mayor agradecimiento es para Dios y mi Churonita del Cisne, por confiarme una misión, por permitirme cumplir mis sueños y ayudarme en este árduo camino.

A mi madre y hermanos, gracias por su ejemplo, disciplina, paciencia y amor.

A mi director de tesis, maestro y amigo Dr. Ever Morales, gracias por su apoyo incondicional, por su confianza y amistad, mi eterno agradecimiento hacia usted.

A mi co-directora de tesis Dra. Jessica Duchicela, gracias por su, amabilidad y colaboración para el desarrollo de este trabajo.

A Ing.-Mat. Pedrito Romero por su soporte académico, dedicación, amistad y colaboración genuina en la realización de este proyecto.

A las autoridades y personal docente de la Escuela Politécnica del Ejército de la carrera de Biotecnología, de manera especial a Silvana Granda, Rodrigo Avalos, Mst. Mónica Jadán y Geomar Zumárraga gracias por la apertura, el apoyo permanente y facilidades para la realización y trámites de este trabajo.

A mis compañeros de tesis Efrén, Daniela, Geova, Diani, Giani, Feli, Anita, Eve por su ayuda, apoyo moral, sus consejos y compañía durante este árduo caminar, de manera especial a David y Kary por ser únicos, genuinos y tener un corazón de oro.

A mis amigos de la universidad a quienes les debo el haber llegado hasta aquí, gracias por ese abrazo, aquella mano amiga y palabras de ánimo, por llorar, reír a mi lado y estar siempre conmigo, pero sobre todo porque nunca me dejaron sola, su apoyo incondicional ha sido mi fuerza para seguir adelante, Dios les pague por todo lo que han hecho por mí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	1
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	2
AUTORIZACIÓN.....	3
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTO.....	6
RESUMEN	16
ABSTRACT.....	18
CAPÍTULO 1:	20
INTRODUCCIÓN	20
1.1 <i>Formulación del problema</i>	<i>20</i>
1.2 <i>Justificación del problema.....</i>	<i>23</i>
1.3 <i>Objetivos de la investigación.....</i>	<i>26</i>
1.3.1 <i>Objetivo general.....</i>	<i>26</i>
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	<i>27</i>
1.4 <i>Marco teórico.....</i>	<i>28</i>
1.4.1 <i>Generalidades de las microalgas y cianobacterias</i>	<i>28</i>
1.4.2 <i>Características de las cianobacterias</i>	<i>28</i>
1.4.3 <i>Clasificación de las Cianobacterias</i>	<i>30</i>
1.4.4 <i>Morfología</i>	<i>31</i>
1.4.5 <i>Células vegetativas, pared celular y envoltura</i>	<i>32</i>
1.4.6 <i>Pigmentos fotosintéticos.....</i>	<i>34</i>
1.4.7 <i>Heterocistos</i>	<i>35</i>
1.4.8 <i>Fijación del Nitrógeno</i>	<i>36</i>
1.4.9 <i>Reproducción</i>	<i>37</i>
1.4.10 <i>Crecimiento y Metabolismo</i>	<i>37</i>
1.4.11 <i>Exopolisacaridos</i>	<i>39</i>
1.4.12 <i>Ecología.....</i>	<i>41</i>
1.4.13 <i>Parámetros Ambientales Moduladores del crecimiento de cianobacterias</i>	<i>44</i>
1.4.14 <i>Producción de Biomasa</i>	<i>46</i>
1.4.15 <i>Cianobacterias como acondicionadoras de suelo</i>	<i>47</i>
1.4.16 <i>CALOTHRIX</i>	<i>51</i>
1.4.17 <i>Morfología</i>	<i>51</i>

1.4.18 Hábitat y Ecología	53
1.4.19 Clasificación de la cianobacteria <i>Calothrix</i>	55
CAPÍTULO 2:	56
METODOLOGÍA.....	56
2.1 Participantes	56
2.2 Zona de estudio.....	56
2.3 Periodo de tiempo de investigación	57
2.4 Diseño	57
2.4.1 Ensayo 1 Determinación de cuatro medios de cultivo sobre la preparación de biomasa del consorcio.....	57
2.4.1.1 Variables de respuesta.....	58
2.4.2 Fase 2: Efecto del tratamiento con biomasa del consorcio.	59
2.4.2.1 Variables de respuesta.....	60
2.5. Procedimiento.....	61
2.5.1 Muestreo de suelos	61
2.5.2 Ensayo I	61
2.5.3 Ensayo II	67
2.5.4 Ensayo III	71
2.5.5 Ensayo IV.....	75
2.5.5 Ensayo V.....	83
2.6 Análisis de datos	88
2.6.1 Viabilidad de las cianobacterias.....	88
2.6.2 Análisis químico del suelo.....	89
CAPITULO 3.....	91
RESULTADOS	91
3.1 Ensayo I	91
3.1.1 Efecto de cuatro medios de cultivo sobre la preparación de biomasa del consorcio.....	91
3.1.2 Evaluación de clorofila	91
3.1.3 Evaluación de carotenoides	93
3.1.4 Evaluación cualitativa de biomasa	95
3.1.5 Evaluación de viabilidad de la cianobacteria <i>Calothrix</i> en los tratamientos	96
3.2 Ensayo II	96
3.2.1 Prueba de viabilidad del consorcio a concentraciones de 3 mL y 6 mL de extracto de suelo.....	96
3.4 Ensayo IV	101

3.4.2	<i>Identificación taxonómica de la cepa de Calothrix observada</i>	102
3.5.2	<i>Evaluación de la viabilidad de los consorcios de cianobacterias inoculadas en suelo</i> ...	107
3.5.3	<i>Acondicionamiento de suelo</i>	114
	CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	147
	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	168
	CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	170
	ANEXO A	171
	ANEXO B	183
	ANEXO C	190
	BIBLIOGRAFIA	171

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la sección de una célula vegetativa de cianobacteria.....	35
Figura 2: <i>Cyanobacteria Calothrix sp.</i> (John et al. ed. 2002).....	53
Figura 3: Medios de cultivo inoculados con cuatro tratamientos	63
Figura 4: Observación de pigmentos fotosintéticos clorofila	65
Figura 5: Observación de la biomasa.	66
Figura 6: Observación viabilidad y predominio de la cianobacteria <i>Calothrix sp</i> a 3 m de extracto de suelo.....	67
Figura 7: A) Muestra de suelo para la elaboración de extracto de suelo B) Cocción del suelo para extraer su extracto.....	68
Figura 8: Estandarización de la concentración de extracto de suelo en medio BG110 a volúmenes de 3 ml y 6 ml con 10 ml de consorcio (A: 6 mL; B: 3 mL).....	69
Figura 9: Exopolisacáridos presentes como envoltura celular en <i>Calothrix sp.</i> (Tinción negativa), el polisacárido se presenta como estructura clara, se distingue la estructura de la cianobacteria.....	70
Figura 10: Observación al microscopio de la viabilidad de las cianobacterias A: 3 ml, B: 6 ml de extracto de suelo.....	71
Figura 11: Crecimiento de colonias de cianobacterias obtenidas a partir de la muestra recolectada, cada colonia fue revisada al microscopio con el fin de encontrar colonias puras. 72	72
Figura 12: Subcultivo de <i>Calothrix sp.</i> en tubos de ensayo.	73
Figura 13: Siembra de los subcultivos de <i>Calothrix</i> en medio BG110 sólido.	74
Figura 14: Colonias aisladas de la cianobacteria <i>Calothrix</i> en medio BG110 sólido.	74
Figura 15: Poblaciones de cianobacterias aisladas con medio de cultivo BG110 sólido.	75
Figura 16: Poblaciones de cianobacterias aisladas con medio de cultivo BG110 sólido.	76
Figura 17: Frascos con cepas de microalgas y cianobacterias aisladas para formación de los consorcios.....	77
Figura 18: Consorcios aislados <i>Calothrix</i> , <i>Leptolyngbya</i> y <i>Anabaena</i>	78
Figura 19: Producción de biomasa del consorcios aislados de <i>Calothrix</i> , <i>Leptolyngbya</i> y <i>Anabaena</i>	78
Figura 20: Escalamiento de consorcios aislados <i>Calothrix</i> , <i>Leptolyngbya</i> y <i>Anabaena</i> a 6L.	79
Figura 21: Sistema de cultivo del consorcio de cianobacterias.	80
Figura 22: Volumen de pool concentrado del consorcio de cianobacterias (800 ml) y sobrenadante.	84
Figura 23: Consorcio de cianobacterias para ser inoculado en suelos.	85
Figura 24: Inoculación del tratamiento testigo con agua.	86
Figura 25: Extracto de clorofila perteneciente al consorcio final que se inoculó al suelo.	86
Figura 26: Suelos inoculados con el consorcio de microalgas y cianobacterias.	87
Figura 27: Muestra de suelo al final del tratamiento que será enviado a analizar al laboratorio.	90
Figura 28: Crecimiento en fase exponencial con el medio de cultivo BG110+S.....	92
Figura 29: Concentración de carotenoides de los distintos tratamientos con respecto al tiempo, mayor crecimiento en fase exponencial con el medio de cultivo BG110+S.	94
Figura 30: Evaluación de la cantidad de biomasa entre los tratamientos, se observa mayor crecimiento en el medio BG110+S (2 A, 2 B, 2 C).....	95
Figura 31: Crecimiento de microalgas y cianobacterias con predominio de <i>Calothrix sp.</i>	96
Figura 32: Efecto competitivo de <i>Anabaena</i> sobre <i>Calothrix</i> . A: <i>Calothrix sp.</i> , B: <i>Anabaena sp.</i> , C: placa con presencia exclusiva de <i>Anabaena sp.</i>	97
Figura 33: Disminución de la población de <i>Calothrix</i> y <i>Anabaena</i>	97
Figura 34: Exopolisacáridos presentes como envoltura celular en <i>Calothrix sp.</i> (Tinción negativa), el polisacárido se observa como la estructura clara.	98

<i>Figura 35: Colonias de Calothrix sp. obtenidas en medio sólido BG110 sólido.</i>	99
<i>Figura 36 Colonias de Calothrix sp. obtenidas en medio sólido BG110 sólido.</i>	100
<i>Figura 37: Estructuras observadas de la cianobacteria Calothrix sp., (A) Hormogonios (células en reproducción), (B) Heterocisto (C) Necridios, (D) Capa mucilaginoso.</i>	101
<i>Figura 38: Predominio de la cianobacteria Calothrix sp. en el consorcio (40 X).</i>	102
<i>Figura 39: Cianobacteria Calothrix sp. en el consorcio (40 X).</i>	104
<i>Figura 40: Especies de la cianobacteria Calothrix sp.</i>	104
<i>Figura 41: Pigmento liposoluble extraído del consorcio de cianobacterias a inocular en el suelo.</i>	106
<i>Figura 42: Acinetos de Anabaena y cianobacteria Calothrix sp.</i>	107
<i>Figura 43: Número de taxa de microalgas y cianobacterias en función del tratamiento al tercer día de experimento.</i>	110
<i>Figura 44: Equivalente numérico de las cruces por taxa presente en los tratamientos al día 6.</i>	111
<i>Figura 45: Número de taxa de microalgas y cianobacterias en función del tratamiento al noveno día de experimento.</i>	113
<i>Figura 46: Equivalente numérico de las cruces por taxa presente en los tratamientos al día 9.</i>	113
<i>Figura 47: Equivalente numérico de las cruces por taxa presente en los tratamientos al día 6.</i>	114
<i>Figura 48: Gráfico de los valores de pH obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	116
<i>Figura 49: Gráfico de residuos, valores de pH obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	116
<i>Figura 50: Gráfico de los valores de M. O obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	118
<i>Figura 51: Gráfico de residuos, valores de M. O obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	118
<i>Figura 52: Gráfico de los valores de NH₄ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	120
<i>Figura 53: Gráfico de residuos, valores de NH₄ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	120
<i>Figura 54: Gráfico de los valores de NO₃ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	122
<i>Figura 55: Gráfico de residuos, valores de NO₃ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	122
<i>Figura 56: Gráfico de los valores de P obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	124
<i>Figura 57: Gráfico de residuos, valores de P obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	124
<i>Figura 58: Gráfico de los valores de K obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	126
<i>Figura 59: Gráfico de residuos, valores de K obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	126
<i>Figura 60: Gráfico de los valores de K obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	128
<i>Figura 61: Gráfico de residuos, valores de Ca obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	128
<i>Figura 62: Gráfico de los valores de Mg obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	130
<i>Figura 63: Gráfico de residuos, valores de Mg obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	130
<i>Figura 64: Gráfico de los valores de Na obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.</i>	132

<i>Figura 65: Gráfico de residuos, valores de Na obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>132</i>
<i>Figura 66: Gráfico de los valores de Al obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>134</i>
<i>Figura 67: Gráfico de residuos, valores de Al obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>134</i>
<i>Figura 68: Gráfico de los valores de Cu obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>136</i>
<i>Figura 69: Gráfico de residuos, valores de Cu obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>136</i>
<i>Figura 70: Gráfico de los valores de Fe obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>138</i>
<i>Figura 71: Gráfico de residuos, valores de Fe obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>138</i>
<i>Figura 72: Gráfico de los valores de Mn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>140</i>
<i>Figura 73: Gráfico de residuos, valores de Mn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>140</i>
<i>Figura 74: Gráfico de los valores de Mn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>142</i>
<i>Figura 75: Gráfico de residuos, valores de Zn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>142</i>
<i>Figura 76: Gráfico de los valores de B obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>144</i>
<i>Figura 77: Gráfico de residuos, valores de B obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>144</i>
<i>Figura 78: Gráfico de los valores de SO₄ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>146</i>
<i>Figura 79: Gráfico de residuos, valores de SO₄ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....</i>	<i>146</i>

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos con las diferentes combinaciones implementadas para el ensayo I.....	58
Tabla 2: Aleatorización de los tratamientos implementados en el ensayo 1.	58
Tabla 3: Longitudes de onda empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos.	59
Tabla 4: Tratamientos aplicados al suelo.	60
Tabla 5: Aleatorización de los tratamientos implementados en el ensayo final.	60
Tabla 6: Longitudes de onda empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos.	61
Tabla 7: Composición del medio de cultivo BG110.	62
Tabla 8: Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013).	82
Tabla 9: Listado de microalgas y cianobacterias observadas en los consorcios.	82
Tabla 10: Tratamientos aplicados a suelo.	84
Tabla 11: Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013).	89
Tabla 12: Prueba no paramétrica de Normalidad (Kruskal Wallis) para la variable clorofila ($\mu\text{g/ml}$).....	92
Tabla 13: Prueba de Duncan para clorofila ($\mu\text{g. mL}^{-1}$).....	93
Tabla 14: Prueba no paramétrica de Normalidad (Kruskal Wallis) para la variable carotenoides ($\mu\text{g/ml}$).....	94
Tabla 15: Prueba de Duncan para carotenoides ($\mu\text{g. mL}^{-1}$).	95
Tabla 16: Comparación de especies de cianobacterias cercanas a <i>Calothrix</i> respecto a su ecología y morfología.....	105
Tabla 17: Crecimiento y sucesión biológica de especies el tercer día de experimento.	108
Tabla 18: Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013).	109
Tabla 19: Crecimiento y sucesión biológica de especies al sexto día de experimento.	109
Tabla 20 Crecimiento y sucesión biológica de especies el noveno día de experimento.	112
Tabla 21: Valores de pH obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos y el blanco B.....	115
Tabla 22: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de pH.	115
Tabla 23: Valores de M. O obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	117
Tabla 24: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de M. O.	117
Tabla 25: Valores de NH_4 obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	119
Tabla 26: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de NH_4	119
Tabla 27: Valores de NO_3 obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	121
Tabla 28: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de NO_3	121
Tabla 29: Valores de P obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	123
Tabla 30: Valores de Ca obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	127
Tabla 31: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Ca.....	127

Tabla 32: Valores de Mg obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	129
Tabla 33: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Mg.....	129
Tabla 34: Valores de Na obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	131
Tabla 35: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Na.	131
Tabla 36: Valores de Al obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	133
Tabla 37: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Al.....	133
Tabla 38: Valores de Cu obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	135
Tabla 39: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Cu.....	135
Tabla 40: Valores de Fe obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	137
Tabla 41: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Fe.	137
Tabla 42: Valores de Mn obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	139
Tabla 43: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Mn.....	139
Tabla 44: Valores de Zn obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	141
Tabla 45: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Zn.	141
Tabla 46: Valores de B obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	143
Tabla 47: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de B.	143
Tabla 48: Gráfico de residuos, valores de B obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 49: Valores de SO_4 obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).....	145
Tabla 50: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de SO_4	145

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1:	<i>Composición y análisis físico químico (medios de cultivo)</i>	171
ANEXO 2:	<i>Análisis Físico químico del extracto de suelo antes de la inoculación del consorcio de cianobacterias.</i>	182
ANEXO 3:	<i>Análisis Físico químico del extracto de suelo luego de inocular el consorcio de cianobacterias.</i>	183
ANEXO 4:	<i>Resultados estadísticos complementarios</i>	183
ANEXO 5:	<i>Ensayo piloto 1. Prueba de Normalidad de varianzas para la variable clorofila ($\mu\text{g/ml}$)</i>	186
ANEXO 6:	<i>Ensayo piloto 1. Prueba de homogeneidad de varianzas para la variable clorofila ($\mu\text{g/ml}$)</i>	187
ANEXO 7:	<i>Prueba no paramétrica de Normalidad para la variable clorofila ($\mu\text{g/ml}$)</i>	188
ANEXO 8:	<i>Prueba de Normalidad de varianzas para la variable carotenoides ($\mu\text{g/ml}$)</i>	188
ANEXO 9:	<i>Ensayo piloto 1. Prueba de homogeneidad de varianzas para la variable carotenoides ($\mu\text{g/ml}$)</i>	189
ANEXO 10:	<i>Ensayo piloto 1. Prueba no paramétrica de Normalidad para la variable carotenoides ($\mu\text{g/ml}$)</i>	190
ANEXO 11:	<i>Definiciones y métodos estadísticos.</i>	190

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo evaluar la capacidad acondicionadora de suelo de un consorcio de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix sp.* El consorcio de cianobacterias fue aislado de una muestra tomada de un acuario ubicado en la parroquia de La Luz de Conocoto- Ecuador. Se determinaron las condiciones óptimas de escalamiento del consorcio que será inoculado en el ensayo final; los ensayos incluyeron la determinación de la concentración adecuada de medio de cultivo, volumen óptimo de extracto de suelo para enriquecer el medio, metodología de aislamiento del consorcio y elección del medio de cultivo que estimulara una mayor producción celular. En el ensayo final en un suelo típico agrícola se inoculó el consorcio en 5 volúmenes (B: blanco, SC: sobrenadante, C-75: 75 mL de consorcio, C-150: 150 mL de consorcio, C-300: 300 mL de consorcio). Se cuantificó el contenido de clorofilas, carotenoides ($\mu\text{g. mL}^{-1}$), peso seco y la viabilidad de las cianobacterias cada cinco días durante el experimento. Los resultados obtenidos indican que la mayor producción se produjo con el medio BG11₀+S presentando valores de 25 $\mu\text{g/ml}$ de clorofila y 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de carotenoides. Las cianobacterias produjeron un crecimiento muy cercano con el medio BG11₀. El segundo bioensayo se trabajó con dos volúmenes de extracto de suelo, obteniendo un óptimo crecimiento de *Calothrix* y *Anabaena* con 3 ml de extracto. Para el tercer ensayo en el cual se realizó el aislamiento de la cianobacteria *Calothrix sp* se obtuvo buenos resultados con la utilización

del medio BG11₀ sin uso del stock III. En el ensayo final de inoculación del consorcio en el suelo se observa un mayor incremento de macro y micro nutrientes al trabajar con 75 ml de biomasa microalgal.

**PALABRAS CLAVE: CIANOBACTERIA, CONSORCIO, MICROALGAS,
AISLAMIENTO, SUELO AGRÍCOLA.**

ABSTRACT

The present investigation assess the ability of soil conditions from a consortium of microalgae and cyanobacteria dominated by *Calothrix* sp., the consortium of cyanobacteria was isolated from a sample taken from an aquarium located in the parish of La Luz de Conocoto - Ecuador. Optimum conditions the scaling of the consortium will be inoculated in the final assay were determined; testing included determining the appropriate concentration of the medium, optimum volume of soil extract to enrich the medium consortium isolation methodology and choice of the culture medium to stimulate increased production cell. In the final test in a typical agricultural soil the consortium was inoculated in 5 volumes (B: black, SC: supernatant, C -75: 75 ml of the consortium, C-150: 150 ml of consortium, C-300: 300 ml consortium). Content of chlorophylls, carotenoids ($\mu\text{g. ml}^{-1}$), dry weight and viability of cyanobacteria in five days during the experiment were quantified. The results indicate that the increased production came with the medium BG11₀ + S with values of 25 mg / ml of chlorophyll and 1.2 mg / ml of carotenoids. The second bioassay was worked with two volumes of soil extract, obtaining an optimal growth *Calothrix* and *Anabaena* with 3 ml of extract. For the third test, isolation of the cyanobacterium *Calothrix* sp., the best result was with medium BG11₀ without adding stock III. In the final test, inoculation with 75 ml of microalgal biomass result the best increase macro and micro nutrients to in soil.

**KEY WORD: CYANOBACTERIA, CONSORTIO, MICROALGAE, ISOLATION,
AGRICULTURAL SOILS.**

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

En el Ecuador los agricultores han incrementado el uso de fertilizantes debido a las necesidades de nitrógeno que demandan los cultivos (Mendez, 2007). Se han venido utilizando fuentes de nitrógeno químico como úrea, nitrato de amonio y sulfato de amonio, sin tomar en cuenta que el uso continuo e inadecuado de estos fertilizantes inorgánicos se vuelve más perjudicial que beneficioso.

El uso de fertilizantes conlleva a la contaminación de los acuíferos subterráneos, debido a la lixiviación de los nitratos hacia el subsuelo (García M., 1989) generando grandes problemas de salud si estos fuesen ingeridos debido a la presencia de nitrato, estos también son causantes del desbalance natural que se genera en el ecosistema. Producto del desequilibrio entre la estructura físico química y orgánica del suelo, la diversidad microbiana se reduce y los nutrientes naturales propios de los suelos escasean (Blanco, 1999). Un ambiente infértil dificulta la producción de nuevos cultivos, debido a que las plantas se vuelven más vulnerables a enfermedades y como

consecuencia la producción agrícola disminuye en cantidad y calidad (Sanchez, 2009). Por tanto, se exige buscar alternativas que promuevan la rehabilitación de suelos para producciones de calidad, garantizando protección y salud poblacional (Sheridan, 2001).

Esta realidad ha forzado al Ecuador, un país netamente agrícola, a establecer herramientas que minimicen el daño que los fertilizantes químicos ocasionan en el suelo. Es así, que entidades públicas como MAGAP se encuentra capacitando a los agricultores para que realicen análisis de suelos previos a la fertilización, facilitando el conocimiento de la composición química de los fertilizantes, la dosis necesaria dependiendo del cultivo y la forma de aplicación. Al adoptar estos conocimientos se les da un uso y aplicación adecuado a los mismos, sin embargo, no se elimina el problema de contaminación (Mendez, 2007).

Por esta razón se acrecienta la necesidad de crear alternativas biológicas que representen opciones más viables de producción para el sector agrícola y garanticen la protección ambiental. Se han venido trabajando proyectos a nivel industrial dedicados a la producción de microorganismos propios del suelo como biofertilizantes (Rodans N. , 2005). Entre los microorganismos más estudiados se encuentran las cianobacterias aptas para la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Joan, 2000). Los consorcios microbianos con cianobacterias se han vuelto sumamente importantes en el área agrícola, debido a su capacidad de fijar nitrógeno, potenciar la producción de

metabolitos secundarios y promover la captación de nutrientes en las plantas (Abed, 2009).

La utilización de microalgas y cianobacterias en la industria alimenticia, farmacéutica y ambiental para el tratamiento de aguas residuales no es nueva, en algunos países estos microorganismos se han convertido en fuente de vitaminas, proteínas y carbohidratos, data de tiempos muy antiguos (Hernández y Olguín, Olguín, & Guieysse, 2006). Bajo condiciones óptimas contienen acerca 4% de total de clorofila en peso seco. Estos microorganismos producen una serie de biomateriales por sus capacidades fotosintéticas generadoras de pigmentos con una adaptación ecofisiológica y plasticidad bioquímica única, son productoras de clorofila, y en su mayoría cultivables en todo tipo de ambientes (Prosperi & Fernandez – Valiente, 1993).

Las cianobacterias pueden trabajar solas o en combinación con otros organismos, de ambas formas presentan una alta capacidad acondicionadora de suelos degradados, son eficaces en el tratamiento de suelos contaminados, suelos muy pobres. En climas áridos o semiáridos incrementan la fertilidad del suelo mediante la producción de exopolisacáridos los cuales mejoran la estructura del suelo y por medio de la fijación biológica del nitrógeno (Mandal B, 1998).

Por otro lado, con el fin de mejorar la eficiencia en cuanto a la producción de pigmentos, proteínas o de metabolitos con actividad biológica, es preciso optimizar el crecimiento de las cianobacterias en función de ciertos parámetros

importantes como la temperatura, irradiancia, pH, salinidad, agitación, concentración y naturaleza de nutrientes en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, es necesario examinar aspectos fundamentales como el tiempo de generación y producción proteica bajo diferentes condiciones de nitrógeno e irradiancia, factores de gran interés tanto en la industria acuícola, de nutrición y dietética (Chico, 2010)

1.2 Justificación del problema

Desde los inicios de la agricultura moderna la principal preocupación se ha centrado en poder contar con un suelo que reúna todas las condiciones necesarias para obtener grandes cosechas sin embargo en la actualidad los agricultores se enfrentan a una nueva problemática como son bajas cosechas y elevados costos de producción atribuidos a suelos escasos y cada vez más pobres (Puotinen, 2009).

Años atrás, la mayor parte de los suelos tenían en un principio un manto superficial rico, las hojas de los árboles y las hierbas cayendo durante miles de años formaron una capa de materia orgánica sobre la superficie del terreno y así se mantenía la fertilidad del suelo donde las tierras podían trabajarse con facilidad. El suelo se consideraba fuente de vida en donde la vida era su principio (Puotinen, 2009).

En contraste con esto, hoy tenemos suelos en donde esa capa orgánica rica en fertilidad capaz de mantener una estructura adecuada y un ambiente propicio para el desarrollo de la vida a desaparecido casi en su totalidad, esto

ha llevado a los agricultores a la necesidad de utilizar y depender cada vez más de la aplicación de fertilizantes químicos para suplir los nutrientes necesarios a sus cultivos con el agravante de que estos mismo productos contribuyen aún más al deterioro antes mencionado, acidificando el suelo, disminuyendo la flora microbiana y contaminando las fuentes de agua (Puotinen, 2009).

Hasta la fecha se ha recurrido a las fuentes de materia orgánica convencional como gallinaza, compostajes y otros tipos de subproductos de descomposición pretendiendo con esto sustituir los aportes propios de la naturaleza, los cuales a pesar de sus beneficios conllevan el uso necesario de grandes cantidades de producto, altos costos de mano de obra y en algunos casos contaminación del ambiente volviéndose una solución poco práctica a este problema (Puotinen, 2009).

Ante esto las cianobacterias se han convertido en una solución real que reúne los beneficios de la materia orgánica sin los inconvenientes antes descritos, se han creado acondicionadores de suelo elaborados a base de algas marinas y microalgas que contiene minerales naturales y aminoácidos para un completo balance de los elementos esenciales del suelo (Puotinen, 2009).

El uso de las algas en la agricultura aportan innumerables beneficios tales como incrementar la capacidad de intercambio catiónico, mejorar la estructura del suelo, estimular la actividad microbiana del suelo, aumentar la capacidad

de retención de agua en el suelo y promover el crecimiento de las raíces de los cultivos. Los procesos bioquímicos permiten una reducción de una posible salinidad, una mejor asimilación de los nutrientes disponibles, una mejor aireación e infiltración de agua en la zona radicular. A parte, el acondicionador aporta una cierta cantidad de nutrientes mayores y menores, altamente asimilables. Permite la mejora de la calidad físico-química del suelo, mantener sus recursos a largo plazo, garantizando la sostenibilidad de la actividad agrícola y evitando el problema del agotamiento de suelos (Solutions, 2012).

Muchas especies de microalgas y cianobacterias son fuente de almacenamiento de diferente tipos de reservas convirtiéndose en fuentes de pigmentos, lípidos, vitaminas y proteínas; hoy en día se han convertido en alimentos alternativos con alto contenido proteico, únicamente las microalgas *Chlorella*, *Dunaliella* y la cianobacteria *Spirulina*, se han producido comercialmente a gran escala, principalmente para la producción de biomasa para alimentos y piensos (Beingerink, 1890).

Además de la fijación de nitrógeno atmosférico, las cianobacterias desempeñan un papel importante en la reducción de la erosión del suelo a causa de capacidad de secretar polisacáridos que se unen suelo. También controlan el aumento de la materia orgánica del suelo y en la producción de ciertas sustancias que mejorar el crecimiento de las plantas. Debido a esta importante característica de la fijación de nitrógeno, la utilidad de cianobacterias en la agricultura para aumentar la producción queda fuera de

toda duda, en el Ecuador no existen investigaciones publicadas sobre la cianobacteria fijadora de nitrógeno *Calothrix* que crece en muchos humedales de agua dulces. Por lo que este trabajo se convierte en uno de los pilares para la investigación dentro del campo de la biotecnología algal en el país; mismo que se ha referido por su importante contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos y exopolisacáridos (Beingerink, 1890). De esta manera se pretende mostrar como el cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en condiciones de laboratorio pueden ser usados como acondicionadores de suelo ya que trabajan reestructurándolo e incorporando elementos esenciales para el desarrollo de las plantas, sin ocasionar daños a la salud ni al ambiente.

Finalmente el presente estudio contribuye en cuanto la información generada potencialmente será soporte de futuras investigaciones en el Ecuador sobre los derivados del metabolismo de *Calothrix sp.* como son: clorofila *a*, ficobiliproteínas, exoenzimas y exopolisacáridos; lo cual permitirá revelar las propiedades biológicas de las mismas y de esta manera aplicarlas en los distintos campos biotecnológicos.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar como acondicionador de suelo y a nivel de laboratorio un consorcio previamente seleccionado de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix sp.*

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar las cianobacteria *Calothrix sp.*, *Leptolyngbya sp.* y *Anabaena sp.* a partir de muestras colectadas del Acuario de Plantas de la parroquia de Conocoto.
- Establecer un protocolo para la producción de un consorcio de cianobacterias *Leptolyngbya sp.* y *Anabaena sp.* con predominio de *Calothrix sp.*, a partir de muestras colectadas del Acuario de Plantas de la parroquia Conocoto.
- Determinar las características morfológicas de las cepas de las cianobacterias *Calothrix sp.*, *Leptolyngbya sp.* y *Anabaena sp.* integrantes del consorcio.
- Determinar el efecto de los medios de cultivo BG11₀, BG11₀ complementado con nitrato, BG11₀ complementado con extracto de suelo y BG11₀ complementado con extracto de suelo y nitrato, sobre el crecimiento del consorcio conformado por las cianobacterias: *Calothrix sp.*, *Leptolyngbya sp.*, *Anabaena sp.* y *Chlorella sp.*
- Determinar la producción de pigmentos liposolubles e hidrosolubles en cultivos discontinuos escalados del consorcio.
- Determinar la producción de biomasa del consorcio en relación al peso seco, contenido de pigmentos y de materia orgánica.
- Evaluar el enriquecimiento de materia orgánica y de nitrógeno en suelos de acuerdo al volumen del consorcio inoculado.

- Aislar la cianobacteria *Calothrix* a partir de un consorcio conformado por microalgas y cianobacterias, proporcionado por el Acuario de Plantas de la parroquia Conocoto.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Generalidades de las microalgas y cianobacterias

Desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga abarca a aquellos microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos similares y que son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, incluye organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias que tienen estructura celular procariota y las restantes microalgas con estructura celular eucariota. Presentan tamaño y forma variada, existen en casi todos los hábitats conocidos, de preferencia en hábitats acuáticos, tanto marinos como dulceacuícolas, aunque algunas viven en el suelo (Aldave-Pajares, 1969).

Las microalgas y cianobacterias se caracterizan por su amplia variabilidad morfológica y fisiológica y así como su gran capacidad de adaptación a diferentes tipos de ambientes, cambios de temperatura, humedad, salinidad, irradiación solar y pH (Stewart I. P.-a., 2006).

1.4.2 Características de las cianobacterias

Presentan características típicas de organismos procariontes, como la presencia de pared celular de peptidoglicanos, ausencia de orgánulos típicos rodeados de membrana y características típicas de organismos eucariontes,

como es la realización de fotosíntesis oxigénica, son interesantes para comprender la evolución de los organismos (Paasche, 1960). Así como su posición filogenética (Woese, 1987).

Las cianobacterias son organismos fotoautótrofos, realizan fotosíntesis, presentan clorofila *a* como pigmento fotosintético primario y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares (Briones, 1997) y fueron conocidas anteriormente como algas verde-azules o Myxophyta, Schizophyta (Ramírez, 2000).

La mayoría de cianobacterias como *Anabaena* y *Calothrix* tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico lo que las convierte en el grupo de procariontes más exitoso y extendido, hallados en diversos ambientes acuáticos y terrestres (Svenning, 1998). Al carecer de orgánulos celulares, las cianobacterias sitúan el transporte de electrones fotosintéticos en los tilacoides donde se asientan los fotosistemas, complejos formados por proteínas, pigmentos fotosintéticos y otros compuestos (Gatenby, 2003).

Entre las principales características que diferencian a este grupo están sus tipos nutricionales quimiheterótrofos facultativos, fotótrofos obligados y fotoheterótrofos, su fase vegetativa unicelular o pluricelular filamentosa, su reproducción asexual, presencia de una capa de mucílago y extensiones protoplasmáticas fibrilares que le permiten realizar movimientos quimiotácticos (Lugo, 2012).

1.4.3 Clasificación de las Cianobacterias

Debido a la gran diversidad la clasificación de cianobacterias hace énfasis hacia el campo didáctico más que al sistemático. Por ejemplo la clasificación que sigue, con nomenclatura botánica, es la propuesta por (Cavalié, 2002).

Reino: BACTERIA

- Subreino: Negibacteria
 - Infrareino: Glycobacteria
 - División: **Cyanobacteria**
 - Subdivisión: Gloeobacteria
 - Clase : Gloeobacteria
 - Orden: Gloeobacterales
 - Subdivisión: Phycobacteria
 - Clase: Chroobacteria
 - Orden: Chroococcales -
Unicelulares o coloniales con pocas células
Grupo heterogéneo. Algunos ejemplos son
Chroococcus, Microcystis (colonias
irregulares), Eucapsis (colonias cúbicas),
Merismopedia (colonias planas).
 - Orden: Pleurocapsales
 - Orden :Oscillatoriales -
Oscillatoria, Spirulina
 - Clase: Hormogoneae
 - Orden: Nostocales-Nostoc,
Anabaena, Calothrix.
 - Orden: Stigonematales -
Stigonema

1.4.4 Morfología

Son organismos procariotas, unicelulares en filamentos con o sin vaina mucilaginosa, de vida individual o en simbiosis. A través de la evolución, las cianobacterias han ido formando hileras de células denominadas tricomas, si este se encuentra rodeado por una envoltura se denomina filamento. Los tricomas se estrechan y están dispuestos más o menos paralelos uno a otro.

En su mayoría son erectos, no ramificados o con ramas falsas, y rodeado por una envoltura firme en la parte inferior de la tricomas (Geitler, 1985)

Muestran una gran variabilidad estructural, debido a que han desarrollado estrategias ecofisiológica de adaptación a diferentes condiciones ambientales de temperatura, humedad, salinidad, irradiación solar y pH (BA, 1987).

Algunas especies de cianobacterias forman pelos en la parte terminal del tricoma, incluso pueden diferenciarlos en toda la longitud del tricoma como sucede en el género *Calothrix*. Estas células se caracterizan por tener sólo pared y carecer prácticamente de citoplasma, a modo de células huecas. En la unión entre estas células se sitúa generalmente la actividad fosfatasa (Strickland J. y., 1972).

Se han clasificado basados de acuerdo a sus caracteres morfológicos y ecológicos, existen formas unicelulares, filamentosas, ramificadas o no, y con gran variación en el tamaño (Casamatta, 2005).

1.4.5 Células vegetativas, pared celular y envoltura

Se encuentran recubiertas por una membrana plasmática simple y muy rica en sistemas enzimáticos. La pared celular de las cianobacterias está compuesta por capas, las capas internas LI y LII son las mismas en todas las cianobacterias. La estructura exterior de la pared LII se modifica de acuerdo a las condiciones ambientales así como de la cantidad de mucílago secretado (envoltura o cápsula) exterior de la pared celular con estructura fibrilar.

La estructura de la pared celular de las cianobacterias es básicamente la misma que la de las bacterias Gram negativas, lo que indica una posible relación entre ambas. La función de la envoltura es proteger a las células de la desecación y también está relacionada con el desplazamiento (Margalef R. 1., 1997).

El constituyente principal de la pared de las cianobacterias son los peptidoglicanos por arriba del 50% de su peso seco (Lee, 1999). En muchos tipos de cianobacterias las células vegetativas se encuentran recubiertas por unas vainas mucilaginosas, también denominadas cápsulas, constituidas por polisacáridos producidos dentro de las células y excretados por ellas, que suponen principalmente una ventaja adaptativa contra la desecación (Walsby B. &, 1974). Además de conferirles capacidad para formar agregados (Weckesser, 1982). Dispersos por el citoplasma se localizan una serie de gránulos que contienen sustancias de reserva y su abundancia depende de las condiciones en las que se encuentren las especies. Estos gránulos son de diferentes tipos: de polifosfato (como reserva de fósforo) (Healey, 1982), de cianoficina (como reserva de material nitrogenado) (SilvaP, 1998), de glucógeno (para reserva de compuestos no nitrogenados) y de poli-8-hidroxi-butirato (como reserva de carbono) (Shapiro, 1973). También pueden encontrarse otras estructuras como son los carboxisomas o cuerpos poliédricos que acumulan ribulosa 1,5, bifosfato carboxilasa (Scandalios, 1993)

y vesículas de gas que son importantes pues permiten el desplazamiento en la columna de agua de las cianobacterias (Walsby B. &, 1974).

1.4.6 Pigmentos fotosintéticos

Las cianobacterias presentan tres tipos de pigmentos: clorofila a, componente del fotosistema I y principal colector de energía; carotenoides, con función protectora contra la oxidación de los pigmentos (Stewart I. P., 2006) y, ficobiliproteínas, cromoproteínas sólo presentes en cianobacterias y algas rojas (Cohen, 1999). Son de diversos tipos: las ficocianinas y aloficocianinas están presentes en todas las cianobacterias, mientras que las ficoeritrinas y ficoeritrocianina son menos frecuentes. Son muy eficientes en la captación de energía, formando parte del sistema antena en unos complejos multimoleculares denominados ficobilisomas, cediéndola mayoritariamente al fotosistema II (Lebeau & Robert, 2003), y además son la porción nitrogenada de la célula con mayor capacidad de movilización, variando su proporción en función de la fuente de nitrógeno que exista en el medio (Albarracín, 2007). En la figura se muestra un esquema de una célula vegetativa.

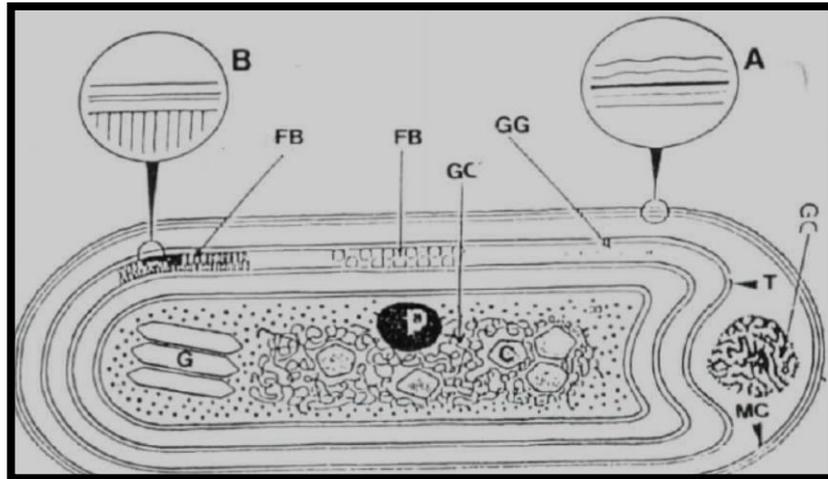


Figura 1: Esquema de la sección de una célula vegetativa de cianobacteria.

1.4.7 Heterocistos

Están presentes en aquellas cianobacterias capaces de fijar N_2 en condiciones aeróbicas, pues están especializados en realizar esa función, al poseer en su interior la enzima nitrogenasa (Brock, 1973). Son células vegetativas, somáticas diferenciadas, de mayor tamaño que las fotosintéticas e incoloras en ellas se realiza la fijación de nitrógeno del medio y también funciona como zona de fragmentación del tricoma (Lugo, 2012). No fijan CO_2 , y no producen O_2 . Están rodeados por una pared celular densa que limita el ingreso de gases atmosféricos, incluyendo el O_2 .

El ambiente interno del heterocisto es anóxico, lo cual es ideal para la nitrogenasa, una enzima notoriamente sensible al O_2 , son incapaces de dividirse, tienen un periodo de actividad fisiológica y vida limitados (Lee, 1999).

La formación de heterocistos depende del suministro de sustancias provenientes de células vegetativas adyacentes que son transferidas directamente por conexiones citoplasmáticas (microplasmodesmas) (Escalona, 2004).

1.4.8 Fijación del Nitrógeno

Para las cianobacterias, la fijación del nitrógeno es un proceso metabólico de suma importancia debido a que le permite incorporar el nitrógeno a la cadena trófica (Mur, 1999). En presencia de luz se produce la fijación del nitrógeno en los heterocistos, estos carecen de fotosistema II, de la fotosíntesis y de su capacidad de desprender oxígeno. Sin embargo, el ciclo de la fotofosforilación, en los heterocistos forma el ATP necesario para la fijación del nitrógeno. Los heterocistos contienen una forma de mioglobina denominada cianoglobina que transporta el oxígeno presente, previniendo la inhibición de la nitrogenasa (Escalona, 2004).

Las cianobacterias se encargan de fijar el nitrógeno (N_2) de la atmósfera en forma de amonio utilizando ATP como fuente de energía y como cofactor molibdeno o vanadio. Cuando las cianobacterias fijan nitrógeno desprenden oxígeno durante la fotosíntesis proceso que inactiva la nitrogenasa (enzima fijadora de nitrógeno). Ante tal condición las cianobacterias han desarrollado mecanismos para evitar la inactivación de la nitrogenasa por oxígeno.

1.4.9 Reproducción

Son un grupo de 5 a 15 células homogéneas, de menor tamaño que las células vegetativas y envueltos por la vaina de dicho tricoma, su función principal es la de reproducción (Falch B., 1995), pudiendo tener incluso movilidad (Weckesser, 1982). La reproducción de las cianobacterias es asexual por fragmentación del tricoma.

Los homogonios son pequeñas partes de tricomas separadas del filamento principal y se alejan por desplazamiento, se forman bien por la muerte de una o más células intercalares denominadas necridios, formados a su vez por la aparición de discos bicóncavos entre dichas células (Economou-Amilli y col., 1984), o bien por separación entre dos células contiguas. Los homogonios pueden ser también unicelulares, denominados gonidios (Geitler, 1985).

1.4.10 Crecimiento y Metabolismo

En las cianobacterias existen tres tipos de nutrición:

Quimioheterotrofia facultativa, capaces de crecer en la oscuridad y con carbono orgánico como fuente de carbono y crecer fototróficamente en la luz (sólo algunas cianobacterias presentan estas condiciones).

Fotótrofos obligados, capaces de crecer sólo en la luz y en medio inorgánico (algunos de ellos son auxótrofos, por lo que requieren pequeñas cantidades de compuestos orgánicos).

Mixotrófica o Fotoheterótrofa, capaces de usar componentes orgánicos como fuente de carbono en la luz pero no en la oscuridad.

El glucógeno es la principal reserva de esqueletos carbonados, que se acumula en luz mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, siendo utilizado en oscuridad mediante la respiración como fuente principal de energía, en el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Patil, 2012).

Poseen un mecanismo de concentración de CO₂ próximo a la Rubisco (R, 1998) lo que mejora la eficiencia de la fotosíntesis en la fijación de carbono inorgánico (Melis, 2005).

La capacidad de utilización de compuestos orgánicos de algunas cianobacterias no es general para todas, más de la mitad de las estudiadas son fotoheterótrofas facultativas, y de éstas un 15 % son quimiheterótrofas (Marsac, 1997). Las cianobacterias son además capaces de utilizar varias formas de N para su crecimiento (NO₃, NH₄⁺ ó N₂), aunque si existe NH₄⁺ toman principalmente este tipo aunque existan otras fuentes (Guerrero y Lara, 1987).

Son capaces de reducir biológicamente el N₂ atmosférico, mediante la actuación de la enzima nitrogenasa, localizada generalmente en los heterocistos (Brock, 1973). El nitrógeno es incorporado a la materia orgánica en forma de NH₄⁺, independientemente de su origen (Stewart I. P., 2006). Las cianobacterias además toman el P en forma de orto fosfato, mediante uno o varios sistemas de transporte activo, aunque cuando existen concentraciones

altas del mismo en el medio la toma se realiza por transporte pasivo, incorporándose después a las distintas rutas metabólicas (Hernández y Olguín, Olguín, & Guieysse, 2006). Son también capaces de utilizar fosfatos orgánicos gracias a la presencia de fosfatasas (Dola Bhowmik, 2010); Grossman y col., 1994) aunque dicha capacidad es diferente en cada estirpe (Woese, 1987).

Las cianobacterias tienen un metabolismo variable que se acopla rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales, lo que beneficia la búsqueda de nuevas fuentes naturales con el fin de obtener compuestos para darles múltiples fines en la industria, estas características las convierten en el grupo de procariotas más exitoso y extendido, hallados en diversos ambientes acuáticos y terrestres (Domínguez, 1999).

1.4.11 Exopolisacaridos

Polisacáridos de origen microbiano que se pueden encontrar como inclusiones intracelulares que actúan como material de reserva o reguladores, como por ejemplo; el glucógeno, el polihidroxitirato (PHB) y otros materiales relacionados (polihidroxiálcanoatos), los cuales protegen a los sustratos de enzimas metabólicas y ejercen muy poca presión osmótica, en ellos se puede encontrar que la secuencia de monómeros se representa por un grupo repetitivo de subunidades; y como polisacáridos extracelulares, que podemos encontrar como material mucilaginoso extracelular en forma de cápsulas o

limos en donde las subunidades pueden ser desde disacáridos hasta hexasacáridos (Strickland J. y., 1972).

Esta formación de material mucilaginoso extracelular por parte de los microorganismos, es una respuesta inmediata a cambios en su medio ambiente y se refleja en la acumulación de exopolisacáridos que le permiten una fuerte adhesión a superficies sólidas así, como también genera cambios en los flujos de soluciones acuosas cuando este lo contiene (Liu X, 2004).

Todavía no es completamente clara la síntesis, pero es aceptado que la síntesis de exopolisacáridos juega un rol importante en la supervivencia y crecimiento de los microorganismos en un amplio rango de condiciones en donde las funciones que presentan la formación de exopolisacáridos por los microorganismos son las siguientes; autoprotección contra la desecación, protección contra depredadores, barrera para la difusión envolviendo o uniendo los iones metálicos, adhesión a superficies sólidas. La producción de exopolisacáridos se da a bajas concentraciones de fosfatos, ya que, un alto contenido originaría que la producción de exopolisacáridos decreciera considerablemente (Coria, 1999).

Por otro lado limitación en la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo hace que la enzima depolimerasa esté ausente, si estuviera presente, rompería los enlaces de polisacáridos evitando la formación y acumulación de exopolisacáridos (Svenning, 1998).

1.4.12 Ecología

Están adaptadas a vivir en ambientes terrestres e incluso en zonas áridas y ambientes hostiles, incluso formando en algunas ocasiones asociaciones simbióticas. Son capaces por tanto de tolerar todo tipo de ambientes y adaptarse a ellos (Woese, 1987).

En ciertas condiciones algunas especies planctónicas pueden desarrollarse rápidamente en grandes cantidades formando las llamadas flores de agua, fundamentalmente en aguas eutroficas, en estas flores de agua se producen sustancias antibióticas (alelopáticas) que detienen el desarrollo de los demás seres planctónicos (Escalona, 2004).

Crece normalmente en medios alcalinos, en los cuales se desarrollan mejor por cuanto utilizan el ion bicarbonato como fuente de carbono para la fotosíntesis (Beingerink, 1890). Se encuentran presentes en todo tipo de ambientes (marinos, terrestres, de agua dulce, etc.) adaptándose a todos ellos, siendo generalmente más tolerantes que las algas eucarióticas a los cambios que se producen en estos hábitats, con la excepción de ambientes con muy bajo pH (Weckesser, 1982).

La mayoría de cianobacterias suelen encontrarse en la naturaleza en grupos de células o filamentos. Estas colonias pueden formarse, bien por agregación de algunos tricomas o por división de los tricomas (Walsby B. &, 1974). La forma de dichas colonias en la naturaleza es una de las características taxonómicas para muchas especies, aunque su forma depende

en muchas ocasiones de las características del ambiente en el que se encuentren. Sin embargo, las cianobacterias filamentosas suelen estar formando parte de los ecosistemas acuáticos sobre todo tipo de sustratos. La mayoría de ellas presentan vainas que protegen los tricomas, adaptándose así a mantenerse en ambientes muy heterogéneos, adhiriéndose a las diferentes superficies por dichas vainas (Margalef R. 1., 1997).

Se encuentran en ambientes terrestres, siempre que exista algún pequeño recurso de agua aunque éste sea intermitente (Hoffmann, 1998), parecen ser los primeros pobladores de zonas volcánicas; desiertos, debido a que son capaces de aguantar largos períodos de sequía (Fleming, 1973). Presentan buenas adaptaciones a la desecación principalmente por la formación de las vainas, muy comunes en las especies terrestres, como sucede por ejemplo con las especies del género *Nostoc* (Aldave-Pajares, 1969). La desecación suele ir unida a un aumento en la salinidad, por lo que algunas cianobacterias son capaces de acumular compuestos osmoprotectores y cuando esas concentraciones disminuyen son capaces de expulsarlos y aguantar así dichos cambios (Rasmussen, 1998).

También se han encontrado en ambientes polares (Walsby B. , 1974). Presentan adaptaciones para soportar cambios en las intensidades de luz e incluso adaptaciones a las exposiciones a rayos ultravioletas. Así por ejemplo parece que la colonia, "sacrifica" las especies de las zonas superiores como medida de protección de las especies situadas en capas inferiores o producen

cambios en la pigmentación de dichos tapetes (Rodans N. , 2005). Otra forma muy común de adaptarse a las intensidades de luz es la de colorear las envueltas como sucede con algunas especies de *Tolypothrix* y *Calothrix*, (Hoffmann, 1988), y en colonias de *Nostoc*, pero en esta ocasión sólo se colorea la envuelta en su parte más periférica (Aldave-Pajares, 1969).

En ambientes oscuros, sin embargo, se ha visto que algunas cianobacterias son capaces de moverse en dirección a la luz (Hader, 1987). Otras adaptaciones se producen cuando existe una disminución de nitrógeno y fósforo (Blanco, 1999), permitiéndoles por tanto sobrevivir en ambientes donde otros organismos lo tienen limitado.

Además algunas cianobacterias poseen fosfatasas unidas a la superficie externa de la membrana celular, lo que les permite obtener el P a partir de compuestos orgánicos (Healey, 1982). Así ciertas especies en condiciones de deficiencia de fosfato, son capaces de consumir en primer término los gránulos de polifosfato y posteriormente diferenciar al final de los tricomas el largo pelo, donde acumulan las enzimas fosfatasas como sucede en *Calothrix parietina* (Whitton y col., 1991a). Las cianobacterias contienen un alto contenido en nitrógeno, y está bien aceptado que son capaces de usar amonio y nitrato para su crecimiento, aunque algunos factores pueden provocar la pérdida de esta habilidad para usar estos sustratos (Beingerink, 1890).

1.4.13 Parámetros Ambientales Moduladores del crecimiento de cianobacterias

Las cianobacterias pueden cultivarse en el laboratorio con luz artificial y en medios inorgánicos sencillos, con presencia de CO₂ o bicarbonato, amonio, nitrato o nitrito. Aquellas que poseen la enzima nitrogenasa pueden fijar N₂ atmosférico.

Requieren condiciones y parámetros básicos como disponibilidad de nutrientes, temperatura, humedad, salinidad, irradiación solar y (Briones, 1997). Para desarrollarse masivamente, la mayoría de estas son suficientemente flexibles en sus requerimientos e interacciones y esta cualidad es muy conveniente cuando se trata de sistemas de cultivo masivos de una especie de interés (Brock, 1973).

Incrementan su desarrollan cuando existe alteración en las condiciones ambientales habituales. Por ejemplo un cambio en la concentración del nitrógeno y fósforo repercutirá en su desarrollo produciendo un avance o un retroceso del mismo (Ramírez, 2000). Suelen ser altamente competitivas ante la deficiencia de nitrógeno y otros elementos, como en el caso de *Nostoc sp.*, *Calothrix sp.*, *Anabaena sp.* y *Leptolyngbya sp.* Además, de presentar elevada capacidad de adaptación a ambientes extremos de pH, deficiencia en nutrientes, alta irradiación solar, condiciones anóxicas, aguas sulfurosas, aguas eutróficas y alcalófilas (Blanco, 1999). Cuando existen limitaciones de fósforo, pueden ser utilizadas las reservas de fósforo acumuladas en los

gránulos de polifosfato. Además algunas cianobacterias poseen fosfatasas unidas a la superficie externa de la membrana celular, lo que les permite obtener el P a partir de compuestos orgánicos (Healey, 1982). Así ciertas especies en condiciones de deficiencia de fosfato, son capaces de consumir en primer término los gránulos de polifosfato y posteriormente diferenciar al final de los tricomas el largo pelo, donde acumulan las enzimas fosfatasas como sucede en *Calothrix parietina* (Woese, 1987).

Contienen un alto contenido en nitrógeno, y está bien aceptado que son capaces de usar amonio y nitrato para su crecimiento, aunque algunos factores pueden provocar la pérdida de esta habilidad para usar estos sustratos (Cavalié, 2002). La capacidad para fijar N_2 atmosférico y reducirlo en NH_4^+ , supone una ventaja en ambientes que carecen de las otras fuentes nitrogenadas inorgánicas frente a otros organismos. Al parecer, la frecuencia con la que aparecen los heterocistos en los filamentos está directamente relacionada con las concentraciones de NO_3 y especialmente con la de NH_4^+ . Poseen una gran adaptabilidad, ocupan medios húmedos, fuentes termales, aguas frías, saladas, dulces y sobrecargadas de sales. Algunas especies son tolerantes a la sequedad y humedad, son organismos reviviscentes, pero sólo se desarrollan en condiciones húmedas. Ciertas especies logran soportar las variaciones en salinidad (eurihalinos) o presentan gran resistencia al ácido sulfúrico. Algunas especies son termófilas, soportan hasta 80-85 grados C^o (Brock, 1973).

Las cianobacterias tiene la capacidad de captar la energía lumínica a través de ficobilisomas, complejos proteicos exclusivos de estos procariontes (NOM-021-RECNAT, 2002). La intensidad de la luz tiene un efecto proporcional en el crecimiento de las microalgas (Beingerink, 1890).

Se ha observado un óptimo crecimiento de microalgas bajo luz continua que bajo ciclos de luz oscuridad en cultivos discontinuos (Strickland J. y., 1972). Sin embargo las máximas tasas de crecimiento bajo iluminación continua no sobrepasa la máxima tasa de crecimiento mantenida en el sistema semicontinuo (Albarracín, 2007). Las células cultivadas bajo periodos de luz-oscuridad muestran características propias para la adaptación a bajas intensidades de luz y mayor eficiencia en la absorción lumínica, si se comparan con células cultivadas bajo luz continua a la misma intensidad (Albarracín, 2007). A pesar de presentar crecimiento favorable bajo condiciones extremas, presentan limitaciones en lo que se refiere al pH del medio en el que se desarrollan. Así, no son capaces de crecer en condiciones de pH inferiores a 4 (Walsby B. &., 1974), tienen preferencia por las aguas neutras a alcalinas, mientras que son rápidamente sustituidas por el fitoplancton eucariótico bajo condiciones acidas (Strickland J. y., 1972).

1.4.14 Producción de Biomasa

Las cianobacterias tienen gran valor en la industria alimenticia, ambiental y farmacológica por lo que su desarrollo es apetecido en la industria (Margalef

R. , 1997). Sin embargo, cada cepa requiere de procesos diseñados para su incremento en la producción de biomasa enriquecida (F. Prieto-García, 2007).

En cianobacterias, la modificación de ciertos factores ambientales puede mejorar su crecimiento y eficiencia en la producción de pigmentos, proteínas y otros metabolitos, lo que facilita su manejo a nivel de laboratorio, brindándole condiciones óptimas en función de los diversos parámetros ambientales (Hoffmann, 1998).

1.4.15 Cianobacterias como acondicionadoras de suelo

Los acondicionadores y mejoradores de suelo son recursos naturales de extraordinaria importancia para corregir limitantes en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos con vocación agrícola.

Los correctores de suelos y acondicionadores de suelo son productos destinados a la mejora del suelo permitiendo tanto la corrección de problemas que perjudican al desarrollo de los cultivos; salinidad, problemas estructurales como la mejora de la calidad del suelo mediante un mejor aprovechamiento de los recursos del propio suelo, así como aquellos aportes que se realicen sobre el mismo. Permite mantener los recursos a largo plazo, garantizando la sostenibilidad de la actividad agrícola y evitando el problema del agotamiento de suelos (Shapiro, 1973).

La actividad de microalgas en un suelo agrícola (bien y permanentemente humedecido) puede ser un factor muy importante (aunque muy poco valorado) en su edafogénesis y fertilidad, sobre todo por el efecto:

Estabilizador de estructura, debido al efecto agregante de los exopolisacáridos coloidales polianiónicos que continuamente son excretados al medio/suelo (sobre todo a un suelo arcilloso y pobre en materia orgánica) (Mandal, 1998).

Bioestimulante del sistema radicular y de la planta en general (por citoquininas y oligosacáridos) (Mandal B, 1998).

Sobre el suelo

- Corrector de acidez
- Corrector de carencias minerales (macr: Ca y K y todos los oligoelementos)
- Estabilizante de estructuras, antierosivos, regenerador-detoxificador de suelos
- Estabilizante de estructura, antierosivo, regenerador- detoxificador de suelos
- Activador de microfauna y microorganismos del suelo, micorrizas
- Aporta macronutrientes y micronutrientes, quelante y acomplejante
- Hidratante (aumento de capacidad de campo)
- Reductor de la salinidad

Las cianobacterias añaden materia orgánica, sintetizan y liberan aminoácidos, vitaminas y auxinas, reducen el contenido de materia oxidable del suelo, proporcionar oxígeno a la rizosfera sumergida, mejoran la salinidad,

tamponan el pH, solubilizan fosfatos y aumentan la eficiencia de uso de fertilizantes en plantas de cultivo (Mandal B, 1998).

Los estudios sobre la utilización de polisacáridos excretados sólo por microalgas (excluyendo polisacáridos de bacterias y hongos) como estructuradores de suelos (áridos) fue sugerida por (Sitte, 2004) y demostrada por primera vez por (Balota, 1996) quienes demostraron un aumento significativo de la estabilidad en suelo seco y en suelo húmedo de los agregados generados tan solo a las seis semanas de la inoculación de suelos con *Chlorella*, *Oscillatoria* y *Nostoc*. Posteriormente (Lee, 1999) y (Melis, 2005) documentaron evidencias empíricas que sugerían la potencialidad comercial de las microalgas como acondicionantes de suelos agrícolas, y en 1987 Meeting publicó los resultados de un ensayo en campos de maíz, donde demostró experimentalmente el aumento significativo de la estabilidad del suelos agrícolas inoculados con *Chlamydomonas mexicana*, siendo del 37% en seco y del 12% en húmedo.

La desecación del suelo es el principal problema de esta aplicación de las algas, que conllevan a la reducción o muerte de las mismas. Obviamente, este inconveniente es fácilmente subsanable en cultivos con riego por goteo automatizado y bajo invernadero, la única aplicación a escala industrial hasta la fecha de esta técnica se realiza en 5000 ha de suelos, en el estado de Washington por la empresa R&D Plant-Soil Inc (BA, 1987). En 1972 Venkataraman dio a conocer el termino algalización, basada en la inoculación

de cianobacterias fijadoras de nitrógeno no simbióticas (*Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Scytonema*, *Plectonema*) tanto en suelos agrícolas anegados como no anegados. Existe una amplia variabilidad en la flora cianobacteriana del suelo (Strickland J. y., 1972) y su biomasa en un suelo agrícola puede oscilar entre 200 kg a 16 tm peso fresco/a y, dependiendo de la estructura de suelo, pueden alcanzar los 30 cm de profundidad por poca luz que llegue.

Esta técnica de algalización implementada al cultivo del arroz (inoculación con 8-10 kg peso seco/ha de un cultivo denso de mezcla de los géneros *Anabaena-Nostoc-Tolypothrix*, a más de 2 millones de hectáreas de arrozales en India (Mendez, 2007) indicaron que la tasa de fertilización nitrogenada por estas técnicas es equivalente a la que aporta el sistema simbiótico tradicional de *Azolla-Anabaena*.

Por otro lado, ensayos realizados en suelos no anegados tanto en clima templado como tropical han demostrado la posibilidad de cultivar diversas estirpes nativas o foráneas de *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, y *Tolypothrix* (Rasmussen, 1998) mientras que, si el suelo estuviera suficientemente humedecido (p.e.: La biomasa de *Nostoc* aumenta 395 veces, tras dos meses de inoculación al suelo, alcanzando hasta 79 kg peso seco/ha, representando más del 66% de la biomasa microalgal del suelo (Meeting *et al.*, 1988), cayendo drásticamente a 3 kg/ha en cuanto se deseca el suelo. La especie que plantea más ventajas parece ser *Anabaena azollae* debido a: Su elevada

producción en tanques de cultivo (18 g/m²/d), elevada actividad nitrogenasa (22 m mol C₂H₄/mg proteína/hora), amplio rango de tolerancia a pH (6-9) y temperatura (20-40 °C), elevada frecuencia de heterocistes, y a que la frecuencia de heterocistes y actividad nitrogenasa no están afectados por salinidad de hasta el 1% NaCl (Briones, 1997). La técnica de algalización presenta varias ventajas extras, añadidas a su efecto fertilizante por aporte de nitrógeno, debidas al aumento de la estructura de suelo y, por la emisión de bioactivadores naturales de crecimiento.

Los efectos beneficioso de la inoculación de cianobacterias al cultivo de tomate es debido a sus componentes que explican sus efectos agronómicos sobre la planta, el suelo, los frutos y los patógenos sean estos como fitohormonas y reguladores del crecimiento (citoquininas, oligosacáridos, betaínas). (Rodans N. , 2005).

1.4.16 CALOTHRIX

1.4.17 Morfología

Calothrix es una cianobacteria que forma colonias bastante oscuras de color pardo oliva, constituidas por filamentos heteropolares, diferenciados en una zona basal unida generalmente al sustrato y una zona apical, simple. Suelen estar solitarias o agrupadas en filamentos contiguos, separadas (no en el mismo mucílago), algunas veces con ramas laterales falsas, orientadas más

o menos en la dirección del crecimiento del filamento, que a veces pueden reptar por el sustrato (De, 2000).

Los filamentos siempre poseen heterocistos, pueden ser cilíndricos intercalares, aquí ocurre la rotura del filamento y una posterior disociación. Los filamentos en ocasiones tienen la parte basal más ancha, finalizan en su parte apical mediante unas células largas, estrechas e hialinas. La vaina siempre está presente, normalmente firme y en ocasiones lamelada de color pardo amarillento. La reproducción es mediante homogonios móviles; así también pueden estar presentes necridios. Poseen tilacoides, clorofila *a* y pigmentos accesorios como β -caroteno y ficocianina.

Tricomas están formados por las células dispuestas en fila que llega a medir 8 – 15 micras de ancho y que suelen acabar en un largo pelo pluricelular. Los filamentos en ocasiones tienen la parte basal más ancha, finalizando en su parte apical mediante unas células largas, estrechas e hialinas. La vaina siempre está presente, normalmente firme y en ocasiones lamelada de color pardo amarillento. Los heterocistes pueden ser basales o en posiciones intermedias, donde puede ocurrir la rotura y disociación del tricoma para formar nuevos filamentos u homogonios móviles; así también pueden estar presentes necridios, para liberarse de la vaina después de la separación del pelo terminal (Kowalski, 2009). Se destaca que los filamentos de *Calothrix* se caracterizan por no presentar acinetos (Díaz, 1959).

La división celular se da de forma perpendicular al eje longitudinal de tricomas (probablemente siempre sin zonas meristemáticas subapicales). Los tricomas se desintegran en heterocitos y se desarrollan por separado en nuevos tricomas. La reproducción también se da por homogonios móviles, que se dividen del tricoma, reciben la ayuda de las células necridias para liberarse de la funda después de la separación del pelo terminal (Kurmayer, 2011).



Figura 2: Cianobacteria Calothrix sp. (John et al. ed. 2002)

1.4.18 Hábitat y Ecología

Este tipo de las cianobacterias a menudo forman capas viscosas en las rocas costeras y algas marinas. También puede aparecer sobre plantas acuáticas, madera, en zonas generalmente húmedas o sumergidas, particularmente no contaminadas. Algunas especies crecen en ambientes

litorales. Al menos una especie de *Calothrix* se sabe que forma parte de algunos líquenes de las costas rocosas (Díaz, 1959).

Calothrix sp. tiene una distribución mundial amplia y se encuentra en una amplia variedad de áreas marinas, de agua dulce y terrestres hábitats como el litoral rocoso (Weckesser, 1982), la Antártida tapetes de cianobacterias (Fumanti et al. , 1995), los campos de arroz (Hoffmann, 1998), los arrecifes tropicales (Fleming, 1973), los ambientes alpinos endolíticos (Sitte, 2004), y aguas termales (Foster, 1995). *Calothrix* y los Rivularia son géneros morfológicamente similares también se conoce que establecen asociaciones simbióticas con varios eucariotas socios (Albarracín, 2007). Las cianobacterias que forman heterocistos son morfológicamente diversa ricos en especies, y forman un grupo monofilético (Beingerink, 1890).

Se sabe muy poco sobre la diversidad genética de *Calothrix* en su estado natural. Recientemente, se demostró que un solo morfotipo de *Calothrix* forma tapetes de cianobacterias compuestos por cinco diferentes genotipos (Hongmei et al., 2005).

La temperatura óptima de crecimiento para *Calothrix* es de 25 – 30 °C. A diferencia de otros géneros *Calothrix no* muestra adaptabilidad a una amplia gama de temperaturas (Brock, 1973).

1.4.19 Clasificación de la cianobacteria *Calothrix*

Las cianobacterias son colocadas taxonómicamente en 5 secciones, de acuerdo con Rippka et al. (1979) Donde el género *Calothrix* sp. pertenece a la sección IV.

- Orden Nostocales.
- División: Cyanophyta
- Clase: Cyanophyceae
- Orden: Nostocales
- Familia: Rivulariaceae
- Género: *Calothrix*
- Especie: sp

CAPÍTULO 2:

METODOLOGÍA

2.1 Participantes

El presente proyecto “Evaluación como acondicionador de suelo y a nivel de laboratorio, de un consorcio previamente seleccionado de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix* sp” fue financiado por el Laboratorio de Docencia perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ubicado en el Campus Politécnico de Sangolquí, con dirección Av. El Progreso s/n - vía Amaguaña. Así como, presupuesto correspondiente a insumos del Proyecto PROMETEO-SENESCYT, a nombre del Dr. Ever Morales.

Como director de tesis del presente trabajo formó parte el Dr. Ever Darío Morales Avendaño, de igual manera se contó con el aporte de la Ing. Jessica Duchicela, Ph.D. en calidad de co-directora de tesis.

2.2 Zona de estudio

El consorcio de cianobacterias utilizado en este trabajo fue aislado de una muestra colectada en un acuario ubicado en la parroquia Conocoto, zona localizada en el cantón Rumiñahui, Ecuador.

2.3 Periodo de tiempo de investigación

La investigación tuvo un tiempo de duración de 8 meses.

2.4 Diseño

2.4.1 Ensayo 1 Determinación de cuatro medios de cultivo sobre la preparación de biomasa del consorcio.

El tipo de diseño experimental empelado para la siembra del consorcio en medio líquido es un (DCA) con un factor (medio de cultivo) y 4 niveles (composición).

Se utilizó este análisis estadístico debido a que su finalidad es comparar dos o más tratamientos y probar la hipótesis de igualdad de los tratamientos con respecto a la media de la correspondiente variable de respuesta. Solo utiliza dos fuentes de tratamiento: tratamientos y error aleatorio, por su nombre *completamente al azar* en el cual las corridas experimentales se realizan es orden aleatorio, de manera que los posibles efectos ambientales y temporales se vayan repartiendo equitativamente entre los tratamientos (Gutiérrez & Vara, 2008).

Se trabajó con un total de 4 tratamientos, 12 unidades experimentales y 48 observaciones.

Se utilizaron cuatro medios de cultivo diferentes: medio de cultivo BG11₀ (control), medio BG11₀ + 1 ml de NO₃Na (2mM), medio BG11₀ + 1 ml extracto de suelo, medio BG11₀ + 1 ml extracto de suelo + 1 ml de NO₃Na (2mM).

En la tabla 2 a continuación se pueden observar los tratamientos con las diferentes combinaciones.

Tabla 1: Tratamientos con las diferentes combinaciones implementadas para el ensayo I.

Medio de cultivo BG11 ₀ (control)	1a
	1b
	1c
Medio BG11 ₀ + 1 ml de NO ₃ Na (2mM)	2a
	2b
	2c
Medio BG11 ₀ + 1 ml extracto de suelo	3a
	3b
	3c
Medio BG11 ₀ + 1 ml extracto de suelo + 1 ml de NO ₃ Na (2mM)	4a
	4b
	4c

Las 12 unidades experimentales fueron ubicadas al azar, y mantenidas a las mismas condiciones de luz $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y agitación continua con un volumen de aire de $0,8 \text{ L. m}^{-1}$ (Tabla 3).

Tabla 2: Aleatorización de los tratamientos implementados en el ensayo 1.

Aleatorización de las unidades experimentales					
16	23	7	1	21	24
2	19	13	35	4	10

2.4.1.1 Variables de respuesta

Viabilidad: Observación de presencia o ausencia de las cianobacterias de interés.

Pigmentos fotosintéticos: Correspondió a los valores de absorbancia resultantes de la medición en espectrofotómetro de 5 mL de cultivo fresco con adición de 2 mL de metanol. Para ello se utilizaron diferentes longitudes de onda de acuerdo al pigmento y solvente orgánico (tabla 4).

Tabla 3: Longitudes de onda empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

PIGMENTO	LONGITUD DE ONDA (nm)
carotenoides	480
Clorofila a	665

2.4.2 Fase 2: Efecto del tratamiento con biomasa del consorcio.

El tipo de diseño experimental que se empleará para los cultivos escalados hasta 10 Lt es un (DCA) con un factor (suelo) y 5 niveles (volumen de biomasa).

Para este ensayo se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento, 25 unidades experimentales y 125 observaciones. La unidad experimental en la evaluación de las características acondicionadoras de suelo del consorcio de cianobacterias *Calothrix*, *Leptolyngbya* y *Anabaena* fueron masetas con 500 g de suelo con diferentes volúmenes de biomasa.

Tabla 4: Tratamientos aplicados al suelo.

Tratamiento	Descripción	Cantidad
B	Testigo (Agua grifo)	600 mL
C- 75	Inoculado con consorcio	75 mL
C-150	Inoculado con consorcio	150 mL
C-300	Inoculado con consorcio	300 mL
SC	Inoculado con sobrenadante	300 mL

Los 5 tratamientos fueron ubicadas al azar y mantenidos a las mismas condiciones de luz $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y agitación continua con un volumen de aire de $0,8 \text{ L. m}^{-1}$. (Tabla 3).

Las 25 unidades experimentales fueron ubicadas al azar y mantenidas a las mismas condiciones de luz y temperatura ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tabla 5: Aleatorización de los tratamientos implementados en el ensayo final.

Aleatorización de las unidades experimentales												
6	3	7	6	1	4	7	2	0	8	1	0	8
2	9	3	5	4	0	2	3	5	9	5	1	3

2.4.2.1 Variables de respuesta

Viabilidad: Observación de presencia o ausencia de las cianobacterias de interés.

Peso Seco: Propiedades de la biomasa.

Pigmentos fotosintéticos: Correspondió a los valores de absorbancia resultantes de la medición en espectrofotómetro de 2 mL de cultivo fresco con adición de 2 mL de dimetilsulfoxido (DMSO). Para ello se utilizaron diferentes longitudes de onda de acuerdo al pigmento y solvente orgánico.

Tabla 6: Longitudes de onda empleadas para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

PIGMENTO	LONGITUD DE ONDA (nm)
Carotenoides	480
Clorofila a	665

2.5. Procedimiento

2.5.1 Muestreo de suelos

Se recolecto suelo agrícola de la Parroquia Izamba (2.918 m.s.n.m., una Latitud:-1.23333 y Longitud:-78.5833, ubicada a cinco kilómetros del norte de Ambato. Posteriormente los suelos fueron trasladados al laboratorio para ser procesados.

2.5.2 Ensayo I

2.5.2.1 Preparación de medios de cultivo

Para el crecimiento del consorcio de cianobacterias se utilizaron cuatro medios de cultivo:

- Medio de cultivo BG11₀ cuya formulación se presenta en la Tabla 7.
- Medio BG11₀ + 1 ml de NO₃Na (2.0 mM).

- Medio BG11₀ + 1 ml de extracto de suelo.
- Medio BG11₀ + 1 ml extracto de suelo + 1.2 ml de NO₃Na (2mM).

2.5.2.2 Medio de cultivo BG11₀

Este medio no contiene fuente de nitrógeno (nitrato de sodio, NaNO₃) como el medio BG11, con la finalidad de promover la fijación del N₂ por el consorcio. La fuente de sodio (Na) es cloruro de sodio (NaCl). El pH del medio BG11₀ es de 8.

Para la preparación de un litro del medio BG11₀ se añade 10 mL de la solución stock I, 10 mL de la solución stock II, 10 mL de la solución stock III y 1 mL de la solución stock IV. Posteriormente se procede a autoclavar el medio de cultivo por 15 minutos a 15 PSI de presión.

Tabla 7: Composición del medio de cultivo BG110.

	Compuesto	Concentración	Vol. final
Solución I	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,0 g	1000 ml
	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 g	
Solución II	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	4,0 g	
	EDTA	0,1 g	
	Na ₂ CO ₃	2,0 g	
Solución III	Citrato de Amonio	0,6 g	
	Ácido Cítrico_(C ₆ H ₈ O ₇)	0,6 g	
Solución IV	H ₃ B ₃	2,86 g	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g	
	Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,39 g	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,8 g	
	Co(NO ₃). 6H ₂ O	0,05 g	
	FeCl ₃	0,22 g	

Fuente: (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stainer, 1979)

2.5.2.3 Obtención del Inóculo

El inóculo a utilizar resultó a partir de un consorcio seleccionado con presencia de dos cepas de *Calothrix sp.* asociada con *Leptolyngbya sp.*, *Anabaena sp.* y *Chlorella sp.*

2.5.2.4 Inoculación y mantenimiento de los medios de cultivo

El experimento se inició con 12 botellas de vidrio autoclavadas que contenían 140 mL de medio BG11₀ líquido a las que se añadió un inóculo de 10 mL del consorcio. Los cultivos se mantuvieron a 27 ± 2 °C, en agitación constante con iluminación continua y a una intensidad de $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un constante de 24 h para acelerar su crecimiento, hasta alcanzar la fase estacionaria, se aforaba paulatinamente con agua destilada hasta llegar al día 20.



Figura 3: Medios de cultivo inoculados con cuatro tratamientos

2.5.2.5 Evaluación de la biomasa presentes en los tratamientos

➤ Cuantificación de pigmentos liposolubles

Se evaluó el porcentaje de clorofila *a* y carotenoides que contenía el consorcio antes de ser inoculado en el suelo. Para lo cual, se tomó 5 mL de cultivo en un tubo de ensayo, con tres réplicas por cada consorcio, se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 15 minutos utilizando una centrífuga DYNAC. Posteriormente se descartó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur de cuello largo. Los pigmentos del pellet se extrajeron mediante la adición de 2 mL de metanol al 95%. Este procedimiento se realizó en la obscuridad para evitar la oxidación de la clorofila.

Para su medición, los extractos se clarifican mediante centrifugación a 10000 r.p.m. durante 5 minutos, luego el sobrenadante se trasvasó a tubos de vidrio. Posteriormente se midió la absorbancia (DO) a 480 y 665nm para carotenoides y clorofila *a* respectivamente, en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D Milton Roy, contra un blanco del solvente correspondiente (Morales Avendaño, 2011).

Este procedimiento se realizó con poca luz para evitar la foto oxidación de los pigmentos.

La concentración de Clorofila *a* se obtuvo a partir de la ecuación propuesta por Marker *et al.* (1980):

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = \left(\frac{DO665 \times 13.14}{\text{vol.de la muestra}} \right) \times \text{vol. del extracto}$$

Para la determinación de carotenoides se utilizó la ecuación propuesta por Strickland & Parsons (1972):

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = \left(\frac{A_{480} \times 4}{\text{vol.de la muestra}} \right) \times \text{vol. del extracto}$$

Los valores se expresarán en $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

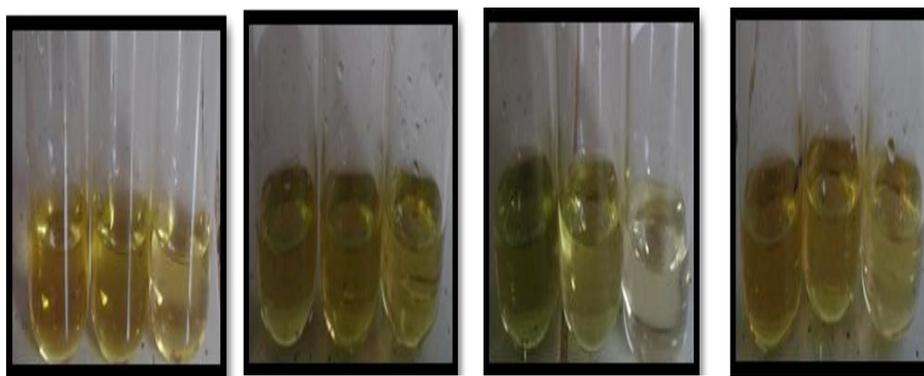


Figura 4: Observación de pigmentos fotosintéticos clorofila

(A: Medio de cultivo BG110, B: Medio BG110 + 1 ml de N_3Na (2mM), C: Medio BG110 + 1 ml extracto de suelo, D: Medio BG110 + 1 ml extracto de suelo + 1 ml de N_3Na (2mM)).

2.6.2.6 Evaluación cualitativa de la cantidad de Biomasa

Se retiró la aireación de las 12 unidades experimentales, luego de varias horas se observó la cantidad biomasa presente en el fondo de cada una de ellas.

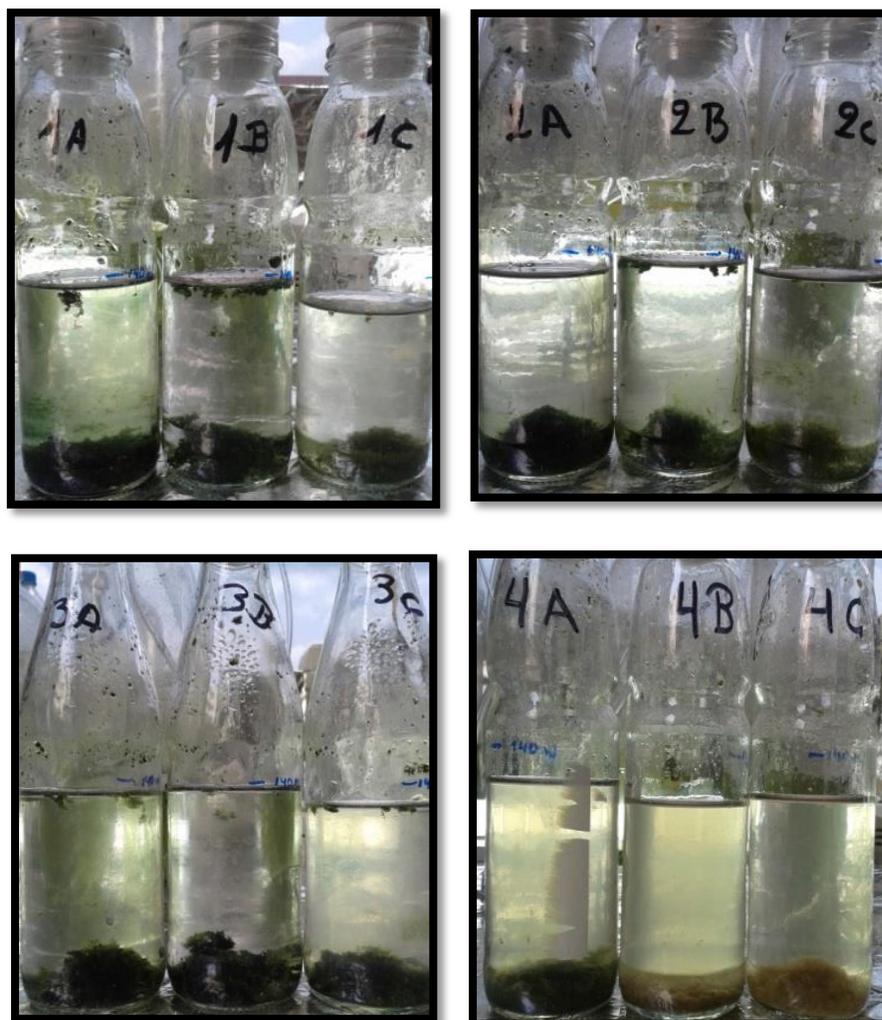


Figura 5: Observación de la biomasa.

(1: Medio de cultivo BG110, 2: Medio BG110 + 1 ml de N₃Na (2mM), 3: Medio BG110 + 1 ml extracto de suelo, 4: Medio BG110 + 1 ml extracto de suelo + 1 ml de N₃Na (2mM)).

2.5.2.7 Evaluación de viabilidad de la cianobacteria *Calothrix* en los tratamientos

El crecimiento y predominio de la cianobacteria *Calothrix* se determinó mediante observación al microscopio óptico cada tres o cuatro días, hasta alcanzar la fase estacionaria (Abalde, 1995).

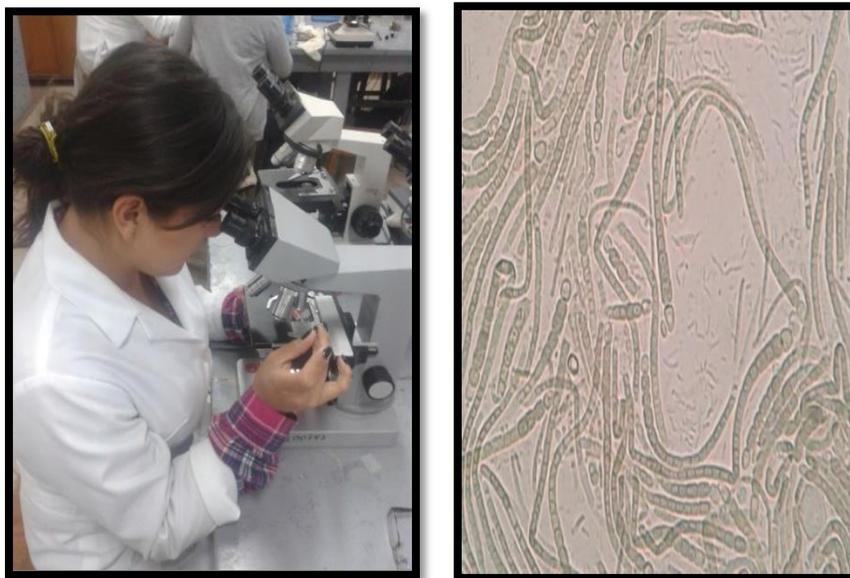


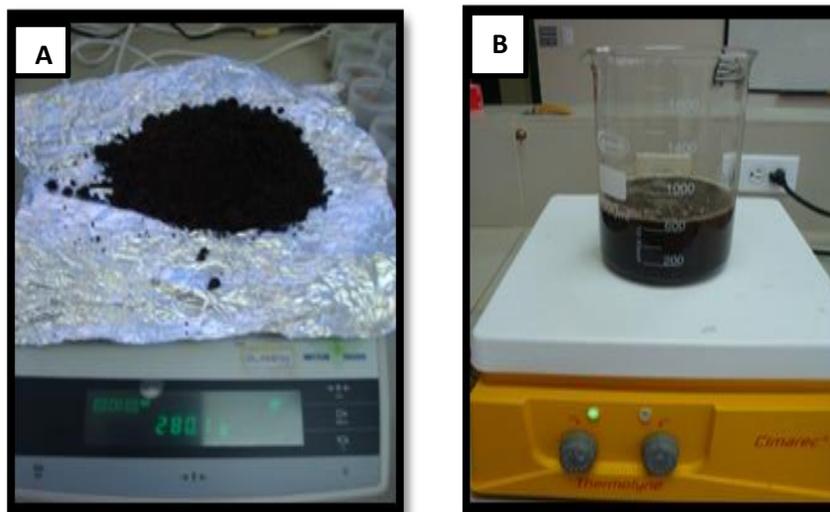
Figura 6: Observación viabilidad y predominio de la cianobacteria *Calothrix* sp a 3 m de extracto de suelo.

2.5.3 Ensayo II

2.5.3.1 Preparación del extracto de suelo

La muestra de suelo utilizada se tomó de un campo cultivado con lechuga ubicado en la parroquia de Izamba en la provincia de Tungurahua. La misma que se encontraba libre de fungicidas e insecticidas, se pesó 278,2 gr. El extracto de suelo se lo preparará según el protocolo de Escuela Superior del Litoral (ESPOL), 1994 y según Arredondo & Voltolina, 2007. Se tomó un volumen de tierra en dos volúmenes de agua destilada y se dejó hervir por más de 60 minutos agitando constantemente. El caldo resultante se dejó reposar por toda la noche para ser filtrado con papel. El filtrado obtenido se lo

colocó en un frasco de vidrio esterilizado en la autoclave a 120 °C 15 psi durante 15 min.



**Figura 7: A) Muestra de suelo para la elaboración de extracto de suelo
B) Cocción del suelo para extraer su extracto.**

2.5.3.2 Prueba de viabilidad del consorcio a concentraciones de 3 ml y 6 ml de extracto de suelo

Se preparó frascos de vidrio de 250 mL con 153 mL de medio de cultivo BG11₀ líquido, se los dividió en 2 diferentes concentraciones (3 mL y 6 mL) estéril a pH 8. Se trabajó con tres repeticiones por cada una de las concentraciones dando un total de 6 frascos ubicados al azar (figura 4).

Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C, con aireación e iluminación continua y a una intensidad de $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un constante de 24h para acelerar su crecimiento, hasta alcanzar la fase estacionaria, se aforaba paulatinamente durante 15 días.

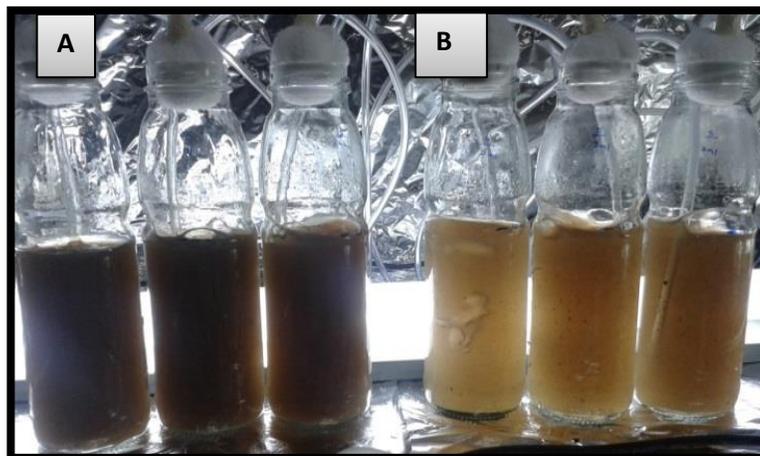


Figura 8: Estandarización de la concentración de extracto de suelo en medio BG110 a volúmenes de 3 ml y 6 ml con 10 ml de consorcio (A: 6 mL; B: 3 mL).

2.5.3.3 Prueba de tinción negativa para detección de exopolisacáridos capsulares

Se realizó para determinar la expresión de polisacáridos capsulares, se observó al microscopio por medio de una tinción negativa con tinta china; esta tinción permite diferenciar el polisacárido ya que se excluyen las partículas componentes de la tinta, por tanto la capa mucilaginosa se observa clara en contraste con el fondo oscuro (figura 5) (Herrera, 2012). El espesor de la capa mucilaginosa es considerablemente grande, un rasgo típico de especies terrestres que lo emplean principalmente como un mecanismo efectivo de retención de agua que las protege de condiciones ambientales desfavorables (De Philippis et al., 2000, Tamaru et al., 2005), el contenido lipídico puede ser incrementado por la imposición de un régimen limitante en nitrógeno,

deficiencia de nutrientes, alta concentración de NaCl, ciclos de luz –oscuridad, fuentes de carbono, edad del cultivo (Otero et al., 1997 y López et al., 2000).

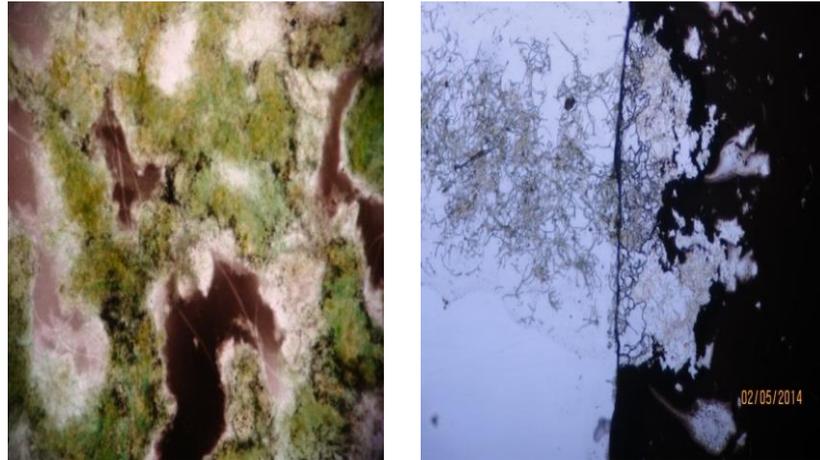


Figura 9: Exopolisacáridos presentes como envoltura celular en *Calothrix* sp. (Tinción negativa), el polisacárido se presenta como estructura clara, se distingue la estructura de la cianobacteria.

2.5.3.4 Evaluación de viabilidad de la cianobacteria *Calothrix* en los tratamientos de 3 mL y 6 mL.

La viabilidad de las cianobacterias determinó tomando una gota de muestra con una pipeta pasteur de plástico y colocándolas en un portaobjetos para ser visualizadas al lente de 40 X de un microscopio óptico.

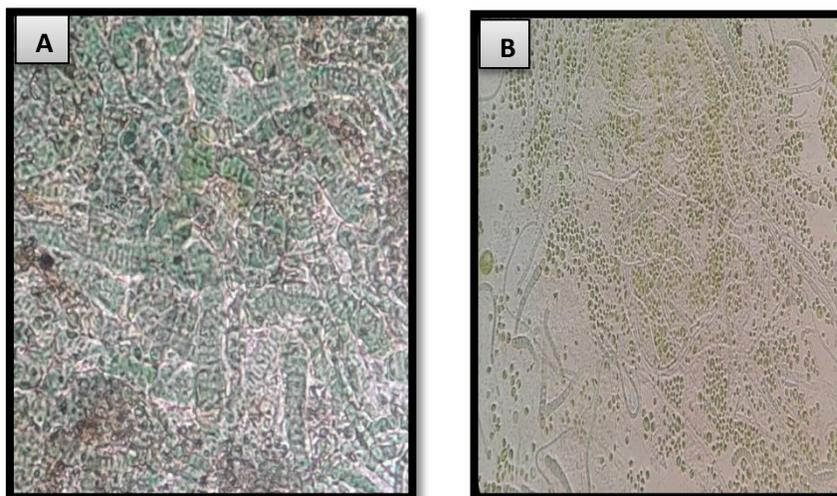


Figura 10: Observación al microscopio de la viabilidad de las cianobacterias A: 3 ml, B: 6 ml de extracto de suelo.

2.5.4 Ensayo III

2.5.4.1 Aislamiento de *Calothrix* sp. a partir de una muestra colectada de un acuario de la ciudadela La Paz de Conocoto.

El procedimiento de aislamiento se lo realizó mediante siembra en medio sólido utilizando la técnica de estriado. Las cajas petri se colocaron en condiciones adecuadas de luz fluorescente $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un constante de 24 h para acelerar su crecimiento durante 3 semanas aproximadamente.

El crecimiento obtenido en las cajas petri fue tomado con una aza bacteriológica y se colocó en tubos vacutainer con 5 mL de medio de cultivo BG11₀ líquido. Se mantuvo a condiciones controladas de luz $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con luz continua por dos semanas semana.

Se preparó nuevas cajas con medio de cultivo BG11₀ sólido, el medio fue inoculado con cuatro gotas de biomasa del cultivo y se esparció en toda la superficie con un asa bacteriológica previamente esterilizada mediante la técnica de estriación en placa.

Las cajas petri sembradas se colocaron invertidas en condiciones controladas, a 25 ± 2 °C, $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 24 h, es decir luz continua por dos semanas. Después de este tiempo se examinaron las colonias obtenidas en las cajas petri invertidas en un microscopio y se seleccionaron las colonias de interés (figura 7).

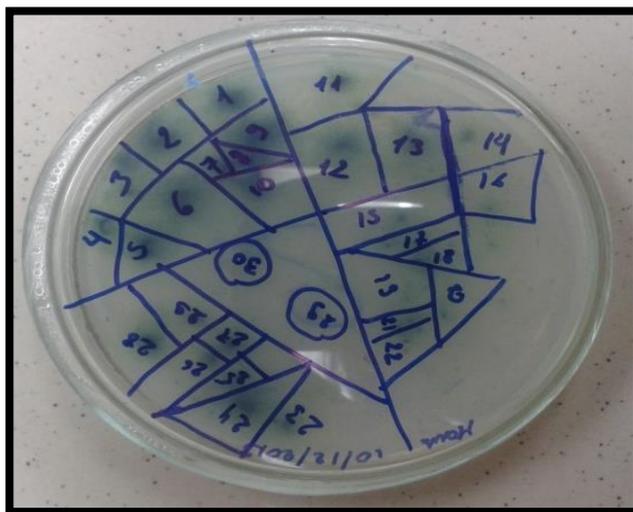


Figura 11: Crecimiento de colonias de cianobacterias obtenidas a partir de la muestra recolectada, cada colonia fue revisada al microscopio con el fin de encontrar colonias puras.

2.5.4.2 Subcultivo y mantenimiento de la cepa de *Calothrix sp*

Para obtener el subcultivo, se seleccionaron las colonias de interés y se las transfirió a tubos vacutainer 10 mL con 5 mL de medio de cultivo GB11₀.

Los cultivos se mantuvieron a temperatura 25 ± 2 °C, intensidad lumínica $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$, paulatinamente a medida que incrementaba la biomasa, se fue aumentando el volumen de los cultivos hasta llegar a 10 mL (Comunicación verbal, Morales, 2012; Blackwell, *et al.*, 1991; Ramasamy *et al.* 2012).



Figura 12: Subcultivo de *Calothrix* sp. en tubos de ensayo.

Para el mantenimiento de la cepa se sembró 1 mL de biomasa en medio sólido manteniéndolos a una temperatura 25 ± 2 °C, y una intensidad lumínica $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Martínez, 2010; Ramasamy *et al.* 2012).

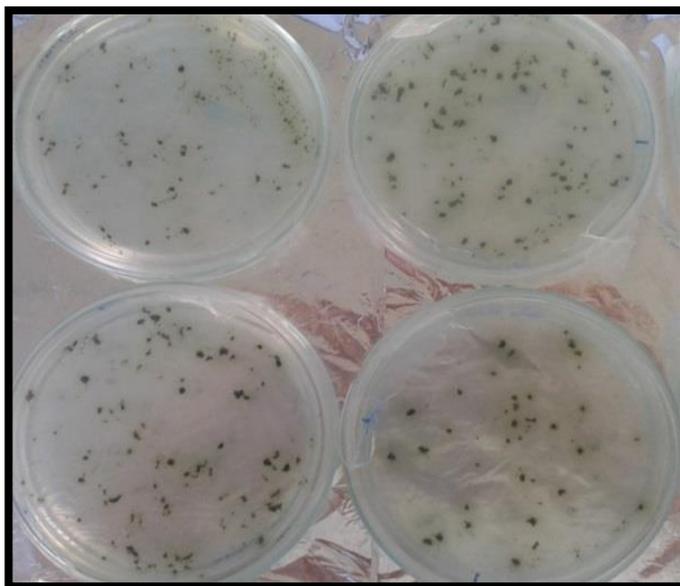


Figura 13: Siembra de los subcultivos de Calothrix en medio BG110 sólido.

Finalmente tras realizar varias siembras a partir de subcultivos se obtuvieron colonias aisladas de la cianobacteria *Calothrix sp.*



Figura 14: Colonias aisladas de la cianobacteria Calothrix en medio BG110 sólido.

2.5.5 Ensayo IV

2.5.5.1 Aislamiento del consorcio de cianobacterias

Las muestras colectadas fueron revisadas en el microscopio, se separó aquellas que no contenían microalgas en tubos vacutainer con medio BG11₀ líquido, posteriormente se volvió a revisar los tubos y se separó únicamente las muestras que contenían las cianobacterias de interés. Se procedió a sembrar las muestras en cajas de Petri estériles mediante la técnica de estriado en condiciones de esterilidad junto al mechero. Luego las cajas de Petri se incubaron en condiciones de luminosidad bajo una lámpara fluorescente lateral marca Philips Daylight de 40 W.

Después de transcurrido un mes aproximadamente, aparecieron las primeras poblaciones de cianobacterias, las mismas que tras ser observadas e identificadas con un microscopio óptico fueron aisladas en medio líquido BG11₀.

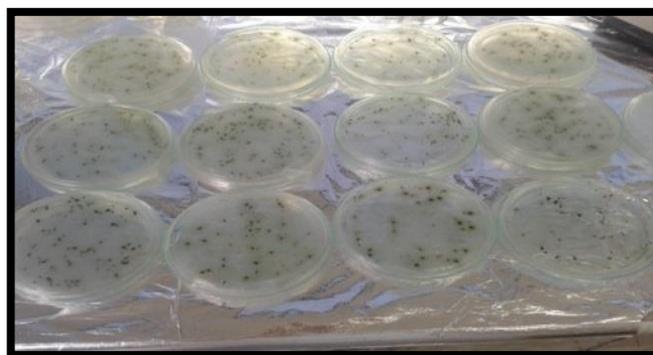


Figura 15: Poblaciones de cianobacterias aisladas con medio de cultivo BG110 sólido.

Luego de tres semanas de incubación en condiciones de luminosidad, una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ se observó nuevamente al microscopio las poblaciones de cianobacterias para identificar y purificar las cianobacterias con una resiembra por agotamiento en medio sólido BG11₀.

A partir de estas observaciones y con ayuda de material bibliográfico se realizó la descripción de las características morfológicas de las cianobacterias.

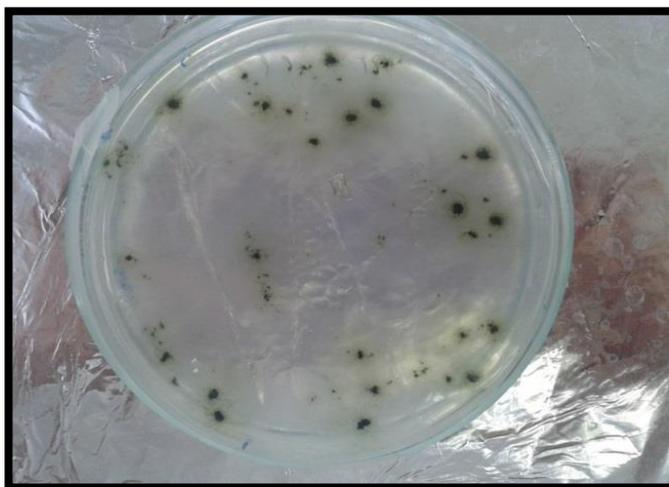


Figura 16: Poblaciones de cianobacterias aisladas con medio de cultivo BG110 sólido.

2.5.5.2 Producción de biomasa de las cianobacterias

Las cepas seleccionadas de cianobacterias fueron colocadas en 10 botellas de plástico de 250 ml con medio BG11₀, luego de 2 semanas se agruparon formando un pool, se obtuvieron cuatro inóculos de 100 mL que fueron colocados cada uno en botellas plásticas de 1000 ml cada uno contenía 350 ml de medio BG11₀ líquido.

Posteriormente se inició el sistema de cultivo discontinuo con cada una de las 4 diferentes cepas de cianobacterias aisladas. Cada frasco de cultivo estaba conectado a un sistema de aireación, conformado por mangueras de plástico, alimentadas por motores para acuarios de 2 salidas. La aireación fue de $0,8 \text{ L. m}^{-1}$, la iluminación fue lateral con lámparas fluorescentes con tubos de 40 W y la intensidad luminosa fue medida con un fotómetro marca Fisher Scientific que permitió colocar los ensayos expuestos a $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (se utilizó el factor propuesto por Ginzburg (1987), es decir, $1 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1} = 51,2 \text{ lux}$). Todos los cultivos mantuvieron el pH aproximadamente en 8 utilizando tirillas para medir el pH marca Macherey- Nagel.



Figura 17: Frascos con cepas de microalgas y cianobacterias aisladas para formación de los consorcios.



Figura 18: Consorcios aislados Calothrix, Leptolyngbya y Anabaena.

Posteriormente se continuó con el proceso de escalamiento de 350 mL a 600 mL de cultivo, igualmente mediante un sistema de cultivo discontinuo alimentados semanalmente con 200 mL de medio de cultivo BG11₀, con una aireación de 0,8 L. m⁻¹, a una temperatura de 27 °C ±2, una intensidad luminosa de 71.78 μmol q m⁻² s⁻¹ y a un pH de 8.

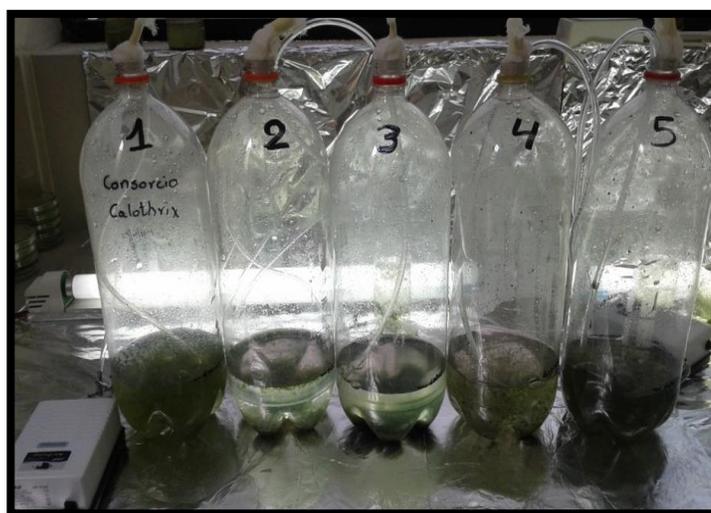


Figura 19: Producción de biomasa del consorcios aislados de Calothrix, Leptolyngbya y Anabaena.

Se continuó escalando los cultivos en botellas plásticas con capacidad de 6 litros, conservando las mismas características de intensidad luminosa, aireación, temperatura y pH.



Figura 20: Escalamiento de consorcios aislados Calothrix, Leptolyngbya y Anabaena a 6 L.

2.5.5.3 Adición de extracto de suelo

Se añadió 1 mL de extracto de suelo por cada 500 mL de consorcio y se agitó continuamente para mezclarlo. Los cultivos se mantuvieron a 27 ± 2 °C, con aireación e iluminación continua y a una intensidad de $71.78 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un constante de 24 h para acelerar su crecimiento, hasta alcanzar la fase estacionaria.

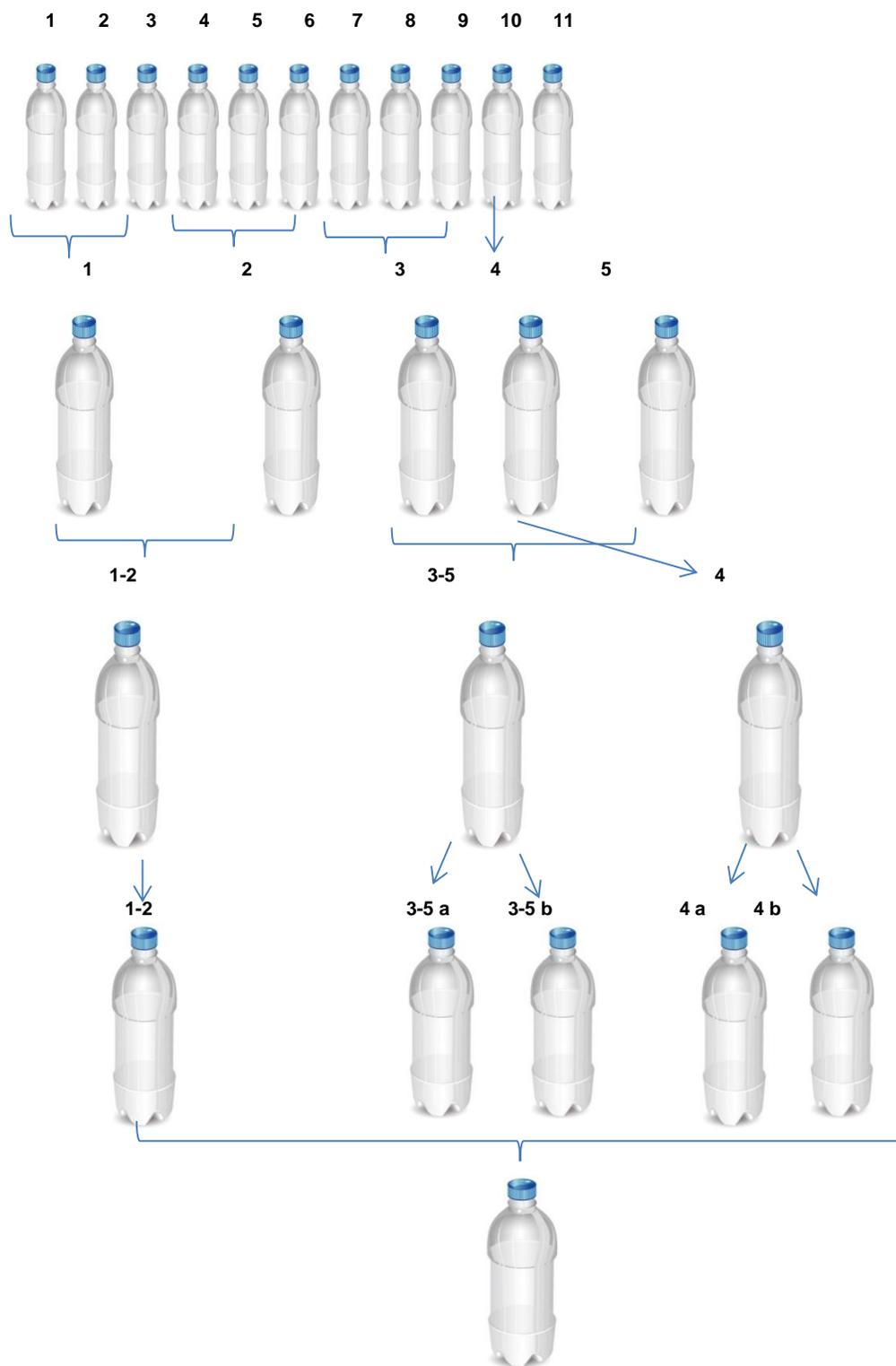
2.5.5.4 Realización del pool

Finalmente se procedió a realizar un pool con los 5 consorcios de cianobacterias, se reunió 16 Lt de consorcio y se continuó manteniendo el sistema de cultivo bajo los mismos parámetros de luminosidad, aireación y pH durante 48 horas hasta su inoculación en los suelos.



Figura 21: Sistema de cultivo del consorcio de cianobacterias.

2.5.5.5 Diagrama de formación del consorcio final



Los consorcios fueron conformados tomando en cuenta el tipo de microalgas y cianobacterias presentes, la evaluación de la viabilidad se cuantificó atribuyéndoles valores numéricos como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013).

Número	Valor
3	Abundante
2	Moderado
1	Escaso

Tabla 9: Listado de microalgas y cianobacterias observadas en los consorcios.

Presencia de:	Consorcio 1	Consorcio 2	Consorcio 3	Consorcio 4	Consorcio 5
<i>Calothrix</i>	3	3	3	3	3
<i>Leptolyngbya</i>	1		1	1	1
<i>Anabaena</i>		1			1
<i>Chlorella</i>	1	1	1	1	
Nemátodos			1		
Hongos ramificados			1		1
Clamidospora				1	
Quistes		1			
Micelios fase crecimiento		1			
Clorofitas esféricas pared celular gruesa					1

2.5.5 Ensayo V

2.5.6.1 Muestreo de suelo para análisis químico

Para el análisis químico del suelo se delimitó el área del terreno, se recolectó las submuestras para lo cual se hizo un recorrido de recolección en forma de zig- zag hasta obtener 500 g de suelo. Se identificó la muestra con todos los datos necesarios (provincia, cantón, parroquia, altura, altitud, longitud, manejo agronómico, edad del cultivo, etc.). Posteriormente las muestras se enviaron al laboratorio de suelos AgroBiolab, para determinación de nutrientes (Bo, Na, S, K, Mn, N, P, Mg, Zn, Fe, Ca, Cu), materia orgánica, capacidad de intercambio de cationes, pH.

2.5.5.2 Preparación del sustrato

Como sustrato se empleó 500 g de tierra negra, se retiró del suelo las impurezas como piedras o ramas. Posteriormente fue tamizada utilizando un cernidero y se lo dejó secar con luz solar en bandejas plásticas.

2.5.5.3 Preparación de los tratamientos

Los tratamientos que se consideraron para el presente estudio se muestran en la tabla 12.

Tabla 10: Tratamientos aplicados a suelo.

Tratamiento	Descripción	Cantidad
B	Testigo (Agua grifo)	150 ml
C-75	Inoculado con consorcio	75 ml
C-150	Inoculado con consorcio	150 ml
C-300	Inoculado con consorcio	300 ml
SC	Inoculado con sobrenadante	150 ml

2.5.5.4 Preparación del inóculo del consorcio de cianobacterias

Se procedió a cosechar el consorcio, mediante sedimentación natural de la biomasa, luego de apagar el sistema de aireación del cultivo. Posteriormente, se decantó el sobrenadante líquido por varias ocasiones hasta obtener únicamente la biomasa que corresponde a un volumen de 800 ml.



Figura 22: Volumen de pool concentrado del consorcio de cianobacterias (800 ml) y sobrenadante.

Luego se aforó a 1700 ml con el sobrenadante, que corresponde al volumen que necesitan 500 g de suelo para quedar completamente humedecidos y fueron divididos y colocados en diferentes erlenmeyers para luego ser inoculados en suelo.



Figura 23: Consorcio de cianobacterias para ser inoculado en suelos.

2.5.6.5 Aplicación de tratamientos en el suelo

Se realizó la aplicación de los tratamientos siguiendo el diseño completamente al azar (DCA). De cada tratamiento se hicieron cinco repeticiones.

La inoculación se realizó a nivel de laboratorio en bandejas plásticas con 500 g de suelo e inoculadas con los tratamientos C- 75, C-150, C-300, B, SC. Para el testigo se aplicó únicamente 150 mL de agua.



Figura 24: Inoculación del tratamiento testigo con agua.

Los consorcios de cianobacterias inoculados presentaron un valor de clorofila de $18 \mu\text{g/ml}$ a 665 nm , se tomaron 4 muestras de 2.5 ml .

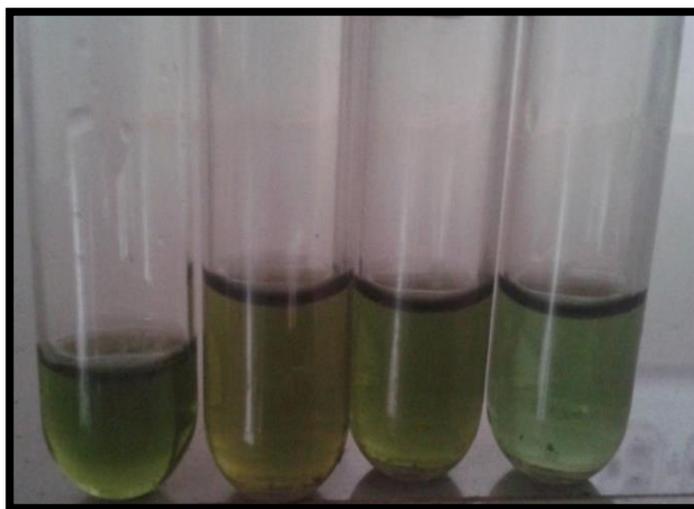


Figura 25: Extracto de clorofila perteneciente al consorcio final que se inoculó al suelo.



Figura 26: Suelos inoculados con el consorcio de microalgas y cianobacterias.

2.5.6.6 Evaluación de la viabilidad de los consorcios de cianobacterias

Luego de haber inoculado el suelo con el consorcio final, se realizó el monitoreo de las poblaciones de microalgas y cianobacterias presentes cada tres días durante tres semanas. Para la observación y recuentos al microscopio, con la ayuda de una pipeta de cuello largo y una malla, se tomó manualmente muestras compuestas de la superficie del suelo de aproximadamente 0,2 g de tres diferentes puntos de cada tratamiento.



Figura 2. 1: Muestreo de la primera semana utilizando malla metálica para colocar los puntos de revisión.

Las muestras se colocaron colocadas en tubos de ensayo con 1,0 ml de agua destilada, para posteriormente ser observadas al microscopio e identificar las microalgas y cianobacterias presentes.

Al finalizar el ensayo se reunió 1 kg de suelo inoculado por cada tratamiento y se envió a ser analizado para determinar la influencia de las poblaciones microbianas.

2.6 Análisis de datos

2.6.1 Viabilidad de las cianobacterias

La viabilidad de las cianobacterias en el sustrato consistió en la observación al microscopio óptico (40 X) de la presencia o ausencia de

crecimiento de cianobacterias sobre el suelo, que previamente fue inoculado con los diferentes tratamientos.

En los tratamientos que evidenciaron una presencia de cianobacterias se identificaron los géneros de las cianobacterias y se procedió a cuantificarlos atribuyéndoles valores numéricos como se muestra en la tabla 13.

Tabla 11: Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013).

Número de cruces	Valor
+++++	Abundantes
++++	Moderados
++	Escasos

2.6.2 Análisis químico del suelo

Para la fase experimental a nivel de laboratorio se empleó un diseño completamente al azar (DCA) en el cual se investigó la influencia de los diferentes tratamientos inoculados en el suelo, a través de análisis químicos (Bo, Na, S, Mn, N, P, Mg, Zn, Ca, Cu, materia orgánica, capacidad de intercambio de cationes, pH). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA).



Figura 27: Muestra de suelo al final del tratamiento que será enviado a analizar al laboratorio.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Ensayo I

3.1.1 Efecto de cuatro medios de cultivo sobre la preparación de biomasa del consorcio

El efecto de los cuatro medios de cultivo se midió en base a la producción de pigmentos fotosintéticos.

Como no se cumple el supuesto de Normalidad se realizó la prueba de Kruskal Wallis para los valores obtenidos durante 20 días de monitoreo como alternativa no paramétrica del método *ANOVA* esta se aplicó a la medición de clorofila y carotenoides.

Se evaluó la biomasa de los días 5 (fase exponencial temprana); 10 (exponencial tardía); 15 (estacionaria temprana) y 20 (estacionaria tardía).

3.1.2 Evaluación de clorofila

Al comparar el crecimiento en función a la edad del cultivo, se observa que este aumenta significativamente en el tiempo (grafico 3.1), debido a la tendencia de las células en aumentar la talla y acumular metabolitos en fase estacionaria (día 15) que generalmente está acompañada de una disminución

en la tasa de crecimiento (Hadden-Carter y Storr, 1984). La mayor producción de clorofila α se observó en el medio de cultivo BG11₀ con extracto de suelo (BG11₀+S) con 16.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al día 5 y 24.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al día 20.

Como resultado del análisis estadístico, no se observa una diferencia significativa respecto a los cultivos evaluados ($p < 0,05$) (tabla 3.1).

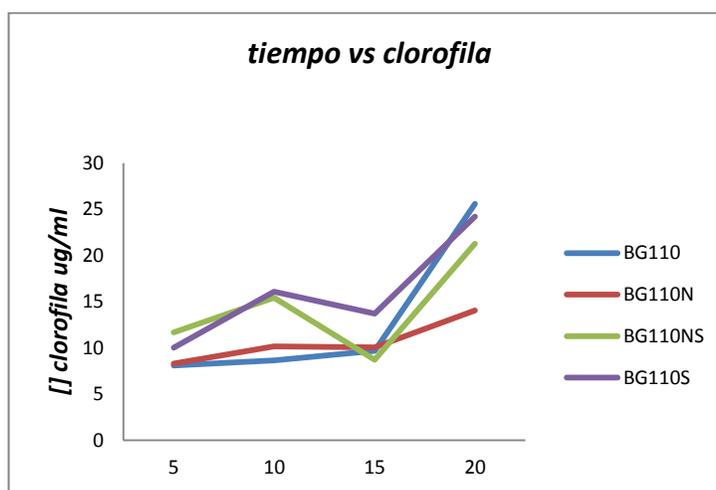


Figura 28: Crecimiento en fase exponencial con el medio de cultivo BG110+S.

Tabla 12: Prueba no paramétrica de Normalidad (Kruskal Wallis) para la variable clorofila (μ/ml).

Prueba de Kruskal Wallis								
Variable	Medio	Días	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Clorofila	BG110	5	3	8.10	3.82	10.30	24.30	0.0601
Clorofila	BG110	10	3	8.63	3.61	9.16		
Clorofila	BG110	15	3	9.67	2.55	8.71		
Clorofila	BG110	20	3	25.60	19.95	20.78		
Clorofila	BG110N	5	3	8.30	4.09	9.10		
Clorofila	BG110N	10	3	10.15	4.50	10.58		
Clorofila	BG110N	15	3	10.04	4.52	10.02		
Clorofila	BG110N	20	3	14.04	6.46	13.60		
Clorofila	BG110NS	5	3	11.68	6.91	14.26		
Clorofila	BG110NS	10	3	15.44	6.33	17.74		
Clorofila	BG110NS	15	3	8.71	7.23	7.59		
Clorofila	BG110NS	20	3	21.29	0.00	21.29		
Clorofila	BG110S	5	3	10.03	2.39	8.84		
Clorofila	BG110S	10	3	16.09	2.11	16.92		
Clorofila	BG110S	15	3	13.70	1.57	13.66		
Clorofila	BG110S	20	3	24.23	5.28	23.34		

Gutiérrez & Vara, 2008. Al suponer la normalidad y varianza constante, éstas no se tienen que cumplir de manera estricta, dado que el procedimiento de ANOVA es robusto o admite desviaciones moderadas de dichos supuestos. Por tanto se aplicó el método Duncan para comparar el efecto de los tratamientos según el tiempo, observándose una diferencia significativa al día 20.

Tabla 13: Prueba de Duncan para clorofila ($\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Test:Duncan Alfa=0.05				
Error: 42.2122 gl: 44				
Días	Medias	n	E.E.	
5	9.53	12	1.88	A
15	10.53	12	1.88	A
10	12.58	12	1.88	A
20	21.29	12	1.88	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

3.1.3 Evaluación de carotenoides

La producción de carotenoides presentan su máximo valor de crecimiento en el medio de cultivo BG11₀ con extracto de suelo (BG11₀+S). Sin embargo estadísticamente sus medias no muestran una diferencia significativa ($p > 0,05$). Los valores más altos para carotenoides estuvieron situados entre 0.91 $\mu\text{g/ ml}$ y 1.21 $\mu\text{g/ ml}$ en fase exponencial.

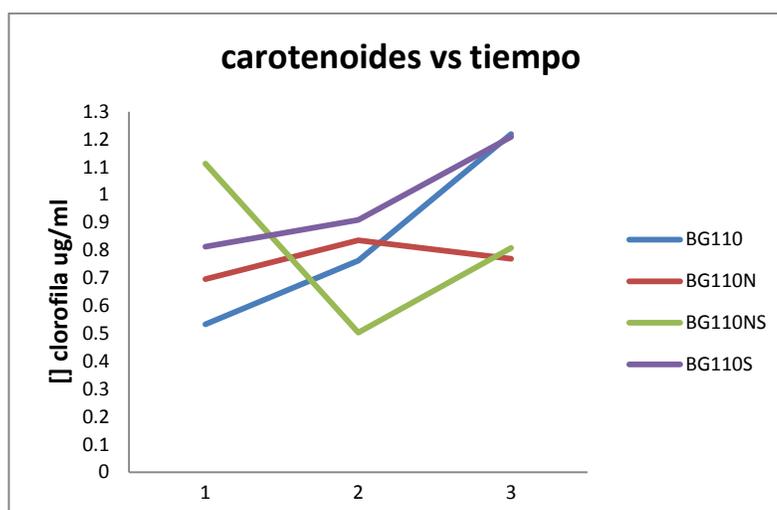


Figura 29: Concentración de carotenoides de los distintos tratamientos con respecto al tiempo, mayor crecimiento en fase exponencial con el medio de cultivo BG110+S.

Tabla 14: Prueba no paramétrica de Normalidad (Kruskal Wallis) para la variable carotenoides (μ /ml).

Prueba de Kruskal Wallis								
Variable	Medio	Días	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
carotenoides	BG110	5.00	3	0.53	0.16	0.61	13.76	0.2457
carotenoides	BG110	10.00	3	0.76	0.18	0.82		
carotenoides	BG110	15.00	3	1.22	0.92	0.96		
carotenoides	BG110N	5.00	3	0.70	0.18	0.75		
carotenoides	BG110N	10.00	3	0.84	0.26	0.88		
carotenoides	BG110N	15.00	3	0.77	0.24	0.86		
carotenoides	BG110NS	5.00	3	1.11	0.41	1.34		
carotenoides	BG110NS	10.00	3	0.50	0.26	0.48		
carotenoides	BG110NS	15.00	3	0.81	0.00	0.81		
carotenoides	BG110S	5.00	3	0.81	0.17	0.84		
carotenoides	BG110S	10.00	3	0.91	0.22	0.79		
carotenoides	BG110S	15.00	3	1.21	0.43	1.10		

Para este análisis también se aplicó el método Duncan con el fin de comparar el efecto de los tratamientos según el tiempo, no se observó diferencias significativas (tabla 3.4).

Tabla 15: Prueba de Duncan para carotenoides ($\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Test:Duncan Alfa=0.05			
Error: 0.1351 gl: 33			
Días	Medias	n	E.E.
10.00	0.75	12	0.11 A
5.00	0.79	12	0.11 A
15.00	1.00	12	0.11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

3.1.4 Evaluación cualitativa de biomasa

Luego de haber dejado decantar los tratamientos se observa y compara la densidad entre ellos, se aprecia mayor cantidad de biomasa en el tratamiento BG11₀ con extracto de suelo (2A, 2B, 2C) figura 3.3.

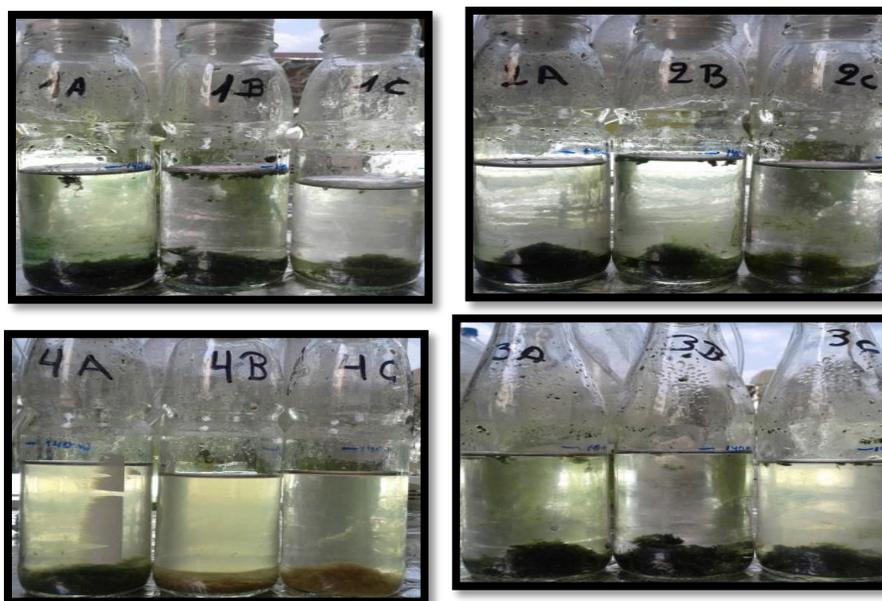


Figura 30: Evaluación de la cantidad de biomasa entre los tratamientos, se observa mayor crecimiento en el medio BG110+S (2 A, 2 B, 2 C).

3.1.5 Evaluación de viabilidad de la cianobacteria *Calothrix* en los tratamientos

En todos los tratamientos hubo crecimiento de la microalga *Chlorella*, cianobacterias *Anabaena* y *Geitlerinema* manteniéndose con predominio la cianobacteria *Calothrix* sp. (figura 3.4).

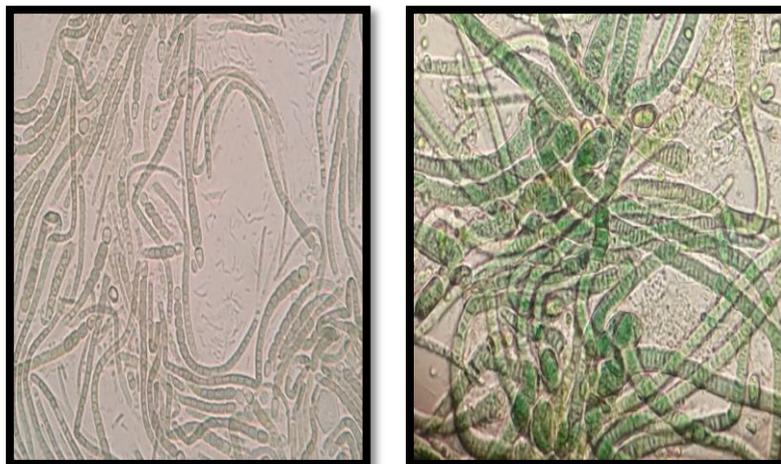


Figura 31: Crecimiento de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix* sp.

3.2 Ensayo II

3.2.1 Prueba de viabilidad del consorcio a concentraciones de 3 mL y 6 mL de extracto de suelo

Con el aumento del extracto de suelo 3 mL se induce el crecimiento de la población de *Anabaena* sobre *Calothrix*, se observa un efecto competitivo a este volumen (figura 3.5).

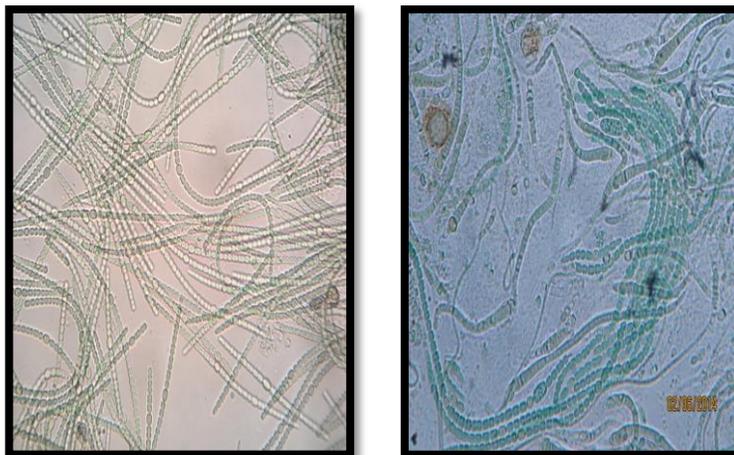


Figura 32: Efecto competitivo de Anabaena sobre Calothrix. A: Calothrix sp., B: Anabaena sp., C: placa con presencia exclusiva de Anabaena sp.

A volumen de 6 mL de extracto de suelo aumenta la población de *Geitlerinema* seguida de *Anabaena* concentración 8:2 respectivamente, disminuye la población de *Calothrix* y *Anabaena* por tanto no se recomienda el uso de esta dosis figura 3.6.

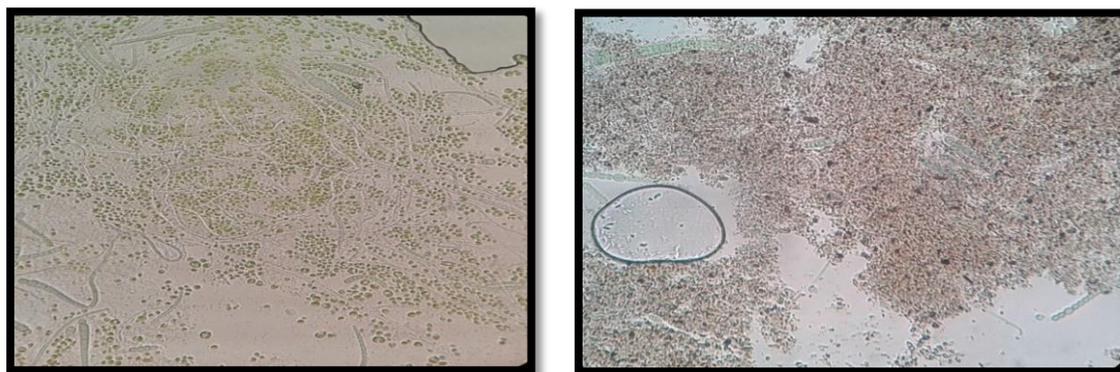


Figura 33: Disminución de la población de Calothrix y Anabaena.

3.2.2 Determinación de exopolisacáridos (prueba de tinción negativa)

Se constató la presencia de polisacárido capsulares donde la capa mucilaginosa se observa clara en contraste con el fondo oscuro (Herrera, 2012). Se observa perfectamente la estructura de *Calothrix* (figura C), el espesor de la capa mucilaginosa es considerablemente grande, un rasgo típico de especies terrestres que lo emplean principalmente como un mecanismo efectivo de retención de agua que las protege de condiciones ambientales desfavorables (De Philippis et al., 2000, Tamaru et al., 2005).

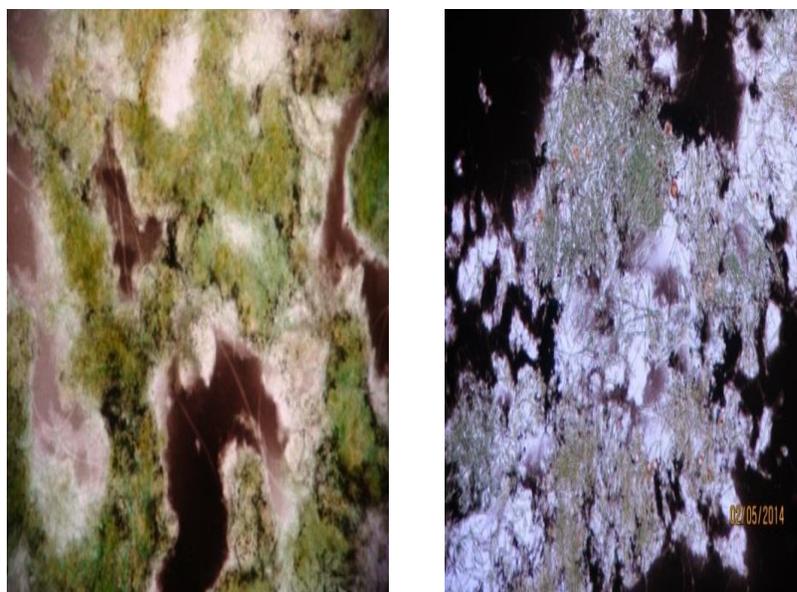


Figura 34: Exopolisacáridos presentes como envoltura celular en *Calothrix* sp. (Tinción negativa, el polisacárido se observa como la estructura clara.

3.3 Ensayo III

3.3.1 Aislamiento de la cepa *Calothrix sp* del consorcio de microalgas y cianobacterias

Como se observa en la figura 3.7 se obtuvo crecimiento de la cianobacteria *Calothrix sp.* a los 20 días de la inoculación de muestras en cajas petri de vidrio con medio BG11₀ sólido. Se observó que la preparación del medio sin la stock III (citrato de amonio y ácido cítrico) presentó un buen crecimiento por lo que se procedió a trabajar de esta manera durante la investigación, se obtuvieron colonias de color verde oscuros, pardo negruzcos irregulares, rodeadas por un halo de células de color café (figura 3.7), se logró aislar la cianobacteria (figura 3.8).



Figura 35: Colonias de *Calothrix sp.* obtenidas en medio sólido BG110 sólido.



Figura 36 Colonias de *Calothrix* sp. obtenidas en medio sólido BG110 sólido.

Se realizaron placas de las colonias obtenidas y se encontraron varias células características de *Calothrix*: (A) Hormogonios (células en reproducción), (B) Heterocisto (C) Necridios, (D) Capa mucilaginosa (figura 3.9).

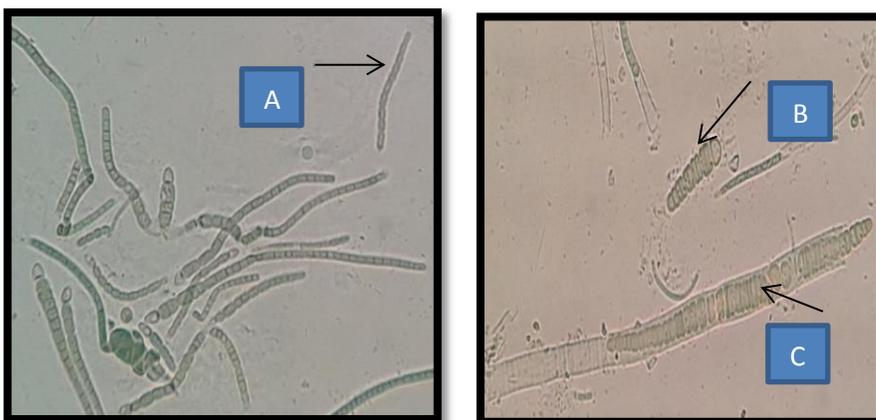




Figura 37: Estructuras observadas de la cianobacteria *Calothrix* sp., (A) Hormogonios (células en reproducción), (B) Heterocisto (C) Necridios, (D) Capa mucilaginosa.

3.4 Ensayo IV

3.4.1 Eficiencia del medio de cultivo para aislamiento del consorcio de cianobacterias

El medio de cultivo BG11₀ fue óptimo para el crecimiento y selectividad de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno por su característica diazotrófica de crecimiento (ausencia de nitrógeno como nitrato de sodio, NaNO₃), con la finalidad de que únicamente persistan cianobacterias que puedan fijar N₂ solas (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stainer, 1979).

Los cultivos fueron escalados a 200 mL por semana manteniendo una tasa de crecimiento celular constante, el consorcio a inocular presento cianobacterias con una proporción de 5:3:2:1 (*Calothrix*, *Geitlerinema*, *Anabaena*, *Chlorella*), se evidencia el predominio de *Calothrix* sp (figura 3.10).

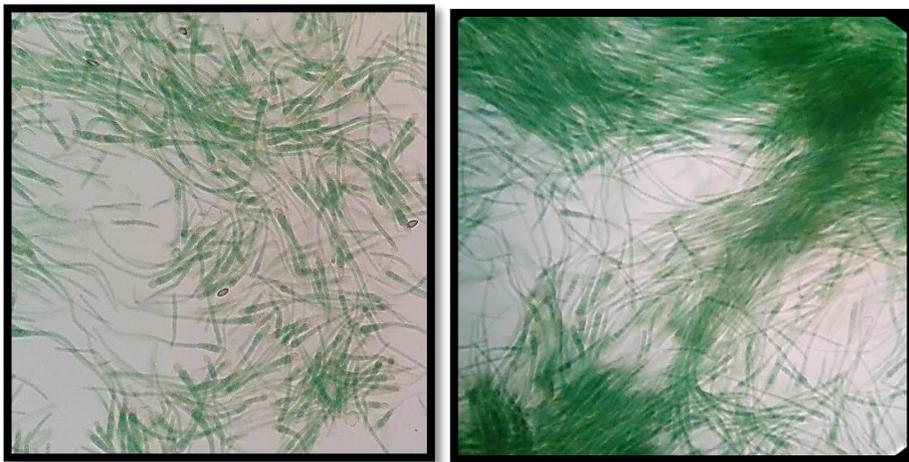


Figura 38: Predominio de la cianobacteria *Calothrix* sp. en el consorcio (40 X).

3.4.2 Identificación taxonómica de la cepa de *Calothrix* observada

La cianobacteria fijadora de nitrógeno que se aisló de la muestra tomada de la Parroquia La Paz de Conocoto se identificó taxonómicamente y se determinó la especie a la que pertenece, esta se caracterizó por ser la más abundante dentro del cultivo, por lo que se describen sus características morfológicas a continuación:

***Calothrix* sp.**

Cianobacteria que forma colonias bastante oscuras de color pardo oliva, constituidas por filamentos heteropolares, diferenciados en una zona basal unida generalmente al sustrato y una zona apical, simple. Suelen estar solitarias o agrupadas en filamentos contiguos, separadas (no en el mismo

mucílago), algunas veces con ramas laterales falsas, orientadas más o menos en la dirección del crecimiento del filamento, que a veces pueden reptar por el sustrato (Des Abbayes, et al., 1989).

Los filamentos siempre poseen heterocistos, pueden ser cilíndricos intercalares, aquí ocurre la rotura del filamento y una posterior disociación. Los filamentos en ocasiones tienen la parte basal más ancha, finalizan en su parte apical mediante unas células largas, estrechas e hialinas. La vaina siempre está presente, normalmente firme y en ocasiones lamelada de color pardo amarillento. La reproducción es mediante homogonios móviles; así también pueden estar presentes necridios. Poseen tilacoides, clorofila *a* y pigmentos accesorios como β -caroteno y ficocianina.

Tricomas están formados por las células dispuestas en fila que llega a medir 8 – 15 micras de ancho y que suelen acabar en un largo pelo pluricelular. Los filamentos en ocasiones tienen la parte basal más ancha, finalizando en su parte apical mediante unas células largas, estrechas e hialinas. La vaina siempre está presente, normalmente firme y en ocasiones lamelada de color pardo amarillento. Los heterocistes pueden ser basales o en posiciones intermedias, donde puede ocurrir la rotura y disociación del tricoma para formar nuevos filamentos u homogonios móviles; así también pueden estar presentes necridios, para liberarse de la vaina después de la separación del pelo terminal (Komárek (1992). Se destaca que los filamentos de *Calothrix* se caracterizan por no presentar acinetos (Díaz, 1959).

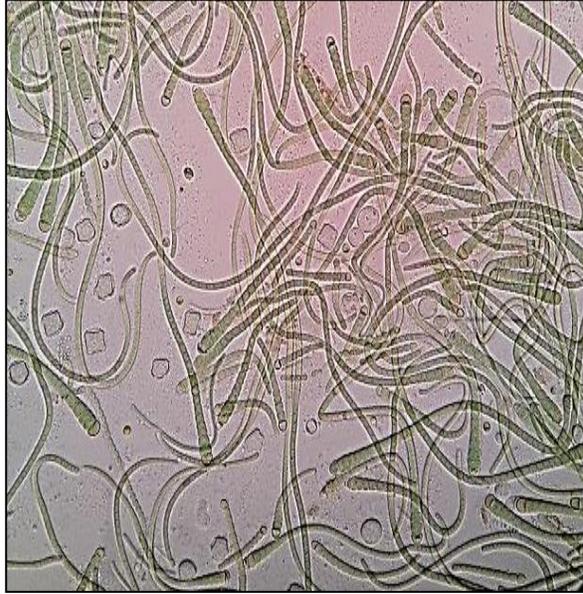


Figura 39: Cianobacteria *Calothrix* sp. en el consorcio (40 X).

Después de tres meses se realizar siembras por agotamiento, se aisló 2 cepas del género *Calothrix* sp., evaluando las características morfológicas y ecológicas (tabla 3.5) se determina que la cepa aislada pertenece a la especie *Calothrix capitularis*.

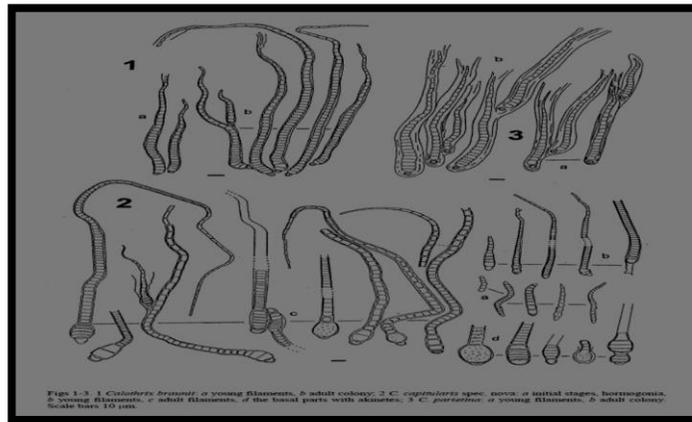


Figura 40: Especies de la cianobacteria *Calothrix* sp.

Fuente: *Fottea, Olomouc*, 7(1): 33–38, 2007.

Tabla 16: Comparación de especies de cianobacterias cercanas a *Calothrix* respecto a su ecología y morfología

Species of genus <i>Calothrix</i>	Characteristics/features							Habitat
	Filament [μm]		Cell [μm]		Sheath color	Hair P/A	Heterocyte Diameter [μm]	
	length	width	length	width				
<i>C. braunii</i> f. <i>concorda</i> **	500-800	2,5-7,5	?	?	?	P	?	On the wall of house in Maricao
<i>C. breviaritculana</i> f. <i>tatrensis</i> *	107-357	5-12	?	?	yellow-brown	P	5-6,6	On the wet rocks
<i>C. clausa</i> **	500-600	24(28)	3-4	3-24	sinicolor	?	?	Epilithic
<i>C. clavata</i> *	100	7	4-15	5-5,5	sinicolor	P	?	Epilithic, soil
<i>C. clavatoides</i> *	200	14	6-20	3-13	sinicolor	P	?	Epilithic
<i>C. codiccola</i> *	400-600	16	?	10-17	sinicolor	P	?	Epiphytic, Codium sp.
<i>C. contareni</i> *	1000	9-15	?	6-8	sinicolor yellowish brown	P	5-7	Epilithic
<i>C. estonica</i> *	2000	3-15	?	3-10	sinicolor	P	8	Epilithic in lake
<i>C. fonticola</i> *	62-75	7,5-10	?	?	?	?	?	In springs, subaquatic
<i>C. fusca</i> f. <i>durabilis</i> *	38-120	7-11,2	?	3,5-11	?	P	?	Alkaline rocks, by <i>Pleurocapsa aurantiaca</i>
<i>C. parietina</i> *	1000	10-12 (18)	7,5-15	5-10	yellowish-brown, lamellate	P	?	Stagnant water, epilithic Controversial taxon determined from many habitats!!! Different iconotypes!!!
<i>C. pulvinata</i> *	200-300	15-18	?	8-12	hyaline, brownish, lamellae	P	?	Periphytic, epilithic
<i>C. simplex</i> **	200-250	To 18	?	10-14	hyaline	P	?	Epilithic in streams
<i>C. violacea</i> *	100-300	?	?	3-6	violet	A	?	Epilithic, calcareous rocks
<i>C. capitularis</i> spec. nova	400-800	to 25	5,5-7,5	7,5-15(17)	hyaline	P	5,5-7,5	Epilithic, calcareous rocks

3.5 Ensayo V

3.5.1 Determinación de pigmentos del consorcio a inocular en el suelo

Las cianobacterias presentan tres tipos de pigmentos: clorofila a, componente del fotosistema I y principal colector de energía; carotenoides, con función protectora contra la oxidación de los pigmentos (Stanier y col, 1971); y, ficobiliproteínas, cromoproteínas sólo presentes en cianobacterias y algas rojas (Cohen- Bazire y Bryant, 1982). Son de diversos tipos: las ficocianinas y aloficocianinas están presentes en todas las cianobacterias, mientras que las ficoeritrinas y ficoeritrocianina son menos frecuentes. La importancia de estos productos derivados del metabolismo de las cianobacterias se debe a su uso como colorantes vegetales y en la biomedicina son usados como sondas

fluorescentes en sustitución de los marcadores radiactivos.(Garbisu, Blanco, Llama, & Serra, 1999).

La media del contenido de clorofila *a* y carotenoides del cultivo final del consorcio de cianobacterias previo a ser inoculado en los suelos fue de 17.9 µg/ml y 5.44 µg/ml respectivamente.

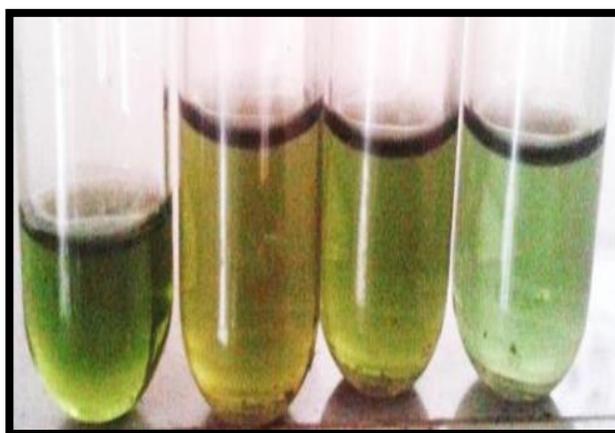


Figura 41: Pigmento liposoluble extraído del consorcio de cianobacterias a inocular en el suelo.

En la figura 3.13 se puede observar el consorcio microbiano que se inoculó al suelo en los diferentes tratamientos, *Calothrix*, *Geitlerinema*, *Anabaena* y *Chlorella* proporción 5:3:2:1 donde *Anabaena* se encuentra representada por un 90% de acinetos (figura 3.13).

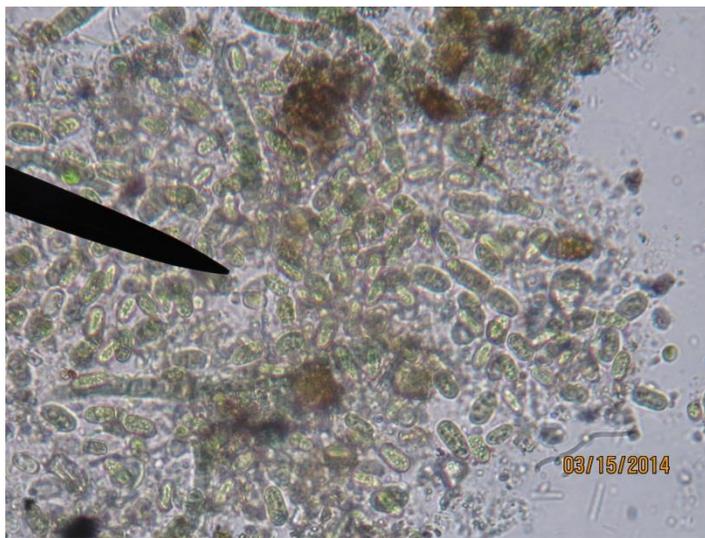


Figura 42: Acinetos de Anabaena y cianobacteria Calothrix sp.

3.5.2 Evaluación de la viabilidad de los consorcios de cianobacterias inoculadas en suelo

Durante la evaluación de la diversidad y frecuencia de géneros presentes en los consorcios inoculados en el suelo, se destacó una alta y continua presencia de *Calothrix sp.* hasta el final del ensayo, seguida de la cianobacteria *Geitlerinema sp.*; también, hubo la presencia de las cianobacterias *Anabana sp.*, además de las microalgas *Navícula sp.*, *Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Chlamydomonas sp.*, y *Desmodesmus sp.* con lo cual se demuestra el crecimiento, sucesión e interacción biológica de especies a medida que van cambiando las condiciones del suelo (sustrato) en relación a la disponibilidad de nutrientes, temperatura, flora bacteriana asociada, iluminación y pH (Morales Avendaño, 2011) (Sánchez, Benintende, & Benintende, 2011).

En el día tres, en la primera toma de muestras del suelo inoculado con los diferentes tratamientos, se observó la presencia de cianobacterias en ciertos tratamientos como lo indica en la Tabla 3.6.

Tabla 17: Crecimiento y sucesión biológica de especies el tercer día de experimento.

Tratamientos	Código	Ausencia/Presencia de Cianobacterias
Testigo (Agua)	B - I	Ausencia
Testigo (Agua)	B - II	Ausencia
Testigo (Agua)	B - III	Ausencia
Testigo (Agua)	B - IV	Presencia
Testigo (Agua)	B - V	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 75 I	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 75 II	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 75 III	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 75 IV	Presencia
Inoculado con consorcio	C - 75 V	Presencia
Inoculado con consorcio	C - 150 I	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 150 II	Presencia
Inoculado con consorcio	C - 150 III	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 150 IV	Presencia
Inoculado con consorcio	C - 150 V	Presencia
Inoculado con consorcio	C - 300 I	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 300 II	Ausencia
Inoculado con consorcio	C - 300 III	Presencia
Inoculado con consorcio	C - 300IV	Presencia
Inoculado con consorcio	C - 300 V	Presencia
Sobrenadante	SC - I	Presencia
Sobrenadante	SC - II	Presencia
Sobrenadante	SC - III	Presencia
Sobrenadante	SC - IV	Ausencia
Sobrenadante	SC - V	Ausencia

En los tratamientos que evidenciaron presencia de cianobacterias se pudo identificar sus diferentes géneros y cuantificarlos por cruces como se detalla en la tabla 3.7, las cruces representa la cantidad de microalgas y

cianobacterias observadas en una gota de muestra tomada con pipeta pasteur plástica vista en lente de 40 X .

Tabla 18: Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013).

Número de cruces	Cantidad
+++++++	Abundante
+++++	Moderado
+	Escaso

Tabla 19: Crecimiento y sucesión biológica de especies al sexto día de experimento.

Tratamientos	Código	Ausencia/Presencia de Cianobacterias	Cantidad
Testigo (Agua)	I B -	Ausencia	
Testigo (Agua)	II B -	Ausencia	
Testigo (Agua)	III B -	Ausencia	
Testigo (Agua)	IV B -	Chlamydomonas	++
Testigo (Agua)	V B -	Ausencia	
Inoculado con consorcio	75 I C -	Ausencia	
Inoculado con consorcio	75 II C -	Ausencia	
Inoculado con consorcio	75 III C -	Ausencia	
Inoculado con consorcio	75 IV C -	Chlorella	+
Inoculado con consorcio	75 V C -	Geitlerinema	+++
		Chlamydomonas	++
Inoculado con consorcio	C - 150 I	Ausencia	
Inoculado con consorcio	C - 150 II	Chlorella	+++
Inoculado con consorcio	C - 150 III	Calothrix	+++

Continúa

Inoculado con consorcio	C - 150 IV	Acinetos de Anabaena	++
Inoculado con consorcio	C - 150 V	Chlorella	++
Inoculado con consorcio	C - 300 I	Calothrix	+++
		Geitlerinema	++
Inoculado con consorcio	C - 300 II	Geitlerinema	++
Inoculado con consorcio	C - 300 III	Chlamydomonas	++
		Chlorella	+
Inoculado con consorcio	C - 300 IV	Calothrix	++
Inoculado con consorcio	C - 300 V	Navícula	+++
		Chlorella	++
Sobrenadante	SC - I	Chlorella	+
Sobrenadante	SC - II	Chlorella	++
Sobrenadante	SC - III	Chlorella	+
Sobrenadante	SC - IV	Chlorella	++
Sobrenadante	SC - V	Chlorella	+

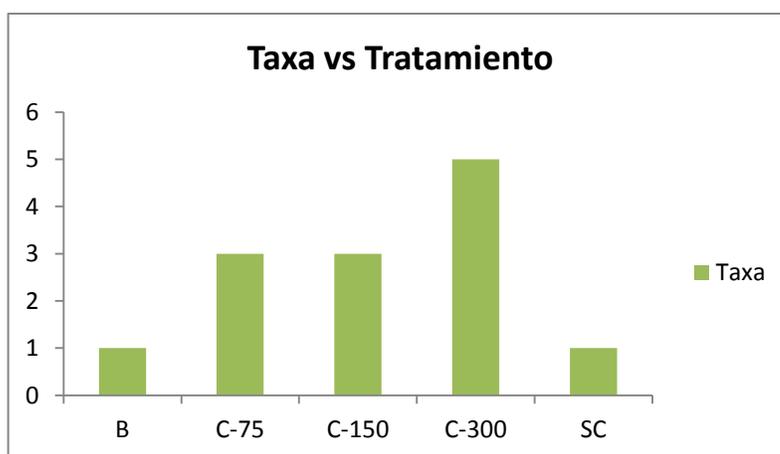


Figura 43: Número de taxa de microalgas y cianobacterias en función del tratamiento al tercer día de experimento.

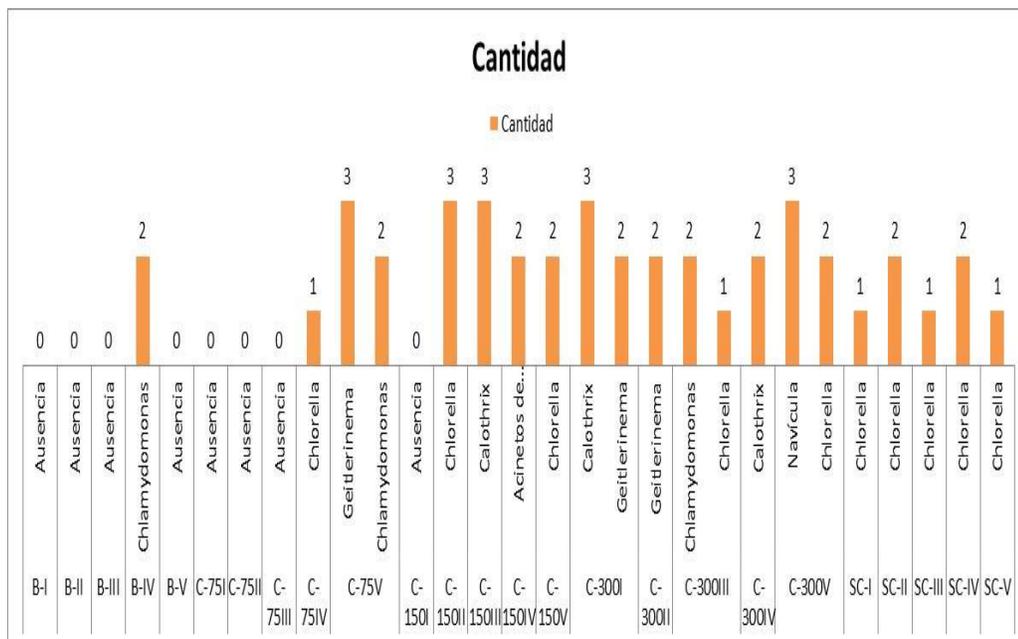


Figura 44: Equivalente numérico de las cruces por taxa presente en los tratamientos al día 6.

Como muestra la tabla 3.6 y la figura 3.15, en el tercer muestreo del tratamiento inoculado con el consorcio, se muestra la presencia de cianobacterias *Calothrix*, *Geitlerinema*, *Anabaena* y *Chroococcum* sp. y microalgas *Desmodesmus*, *Navícula*, *Chlorococcum*, *Chlorella* y *Chlamydomonas* sp.

Tabla 20: Crecimiento y sucesión biológica de especies el noveno día de experimento.

Tratamientos	Código	Ausencia/Presencia de Cianobacterias	Valor numérico
Testigo (Agua)	B - I	<i>Desmodesmus</i>	++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Chlorococcum</i>	+
Testigo (Agua)	B - II	<i>Chlorella</i>	+++
		<i>Navícula</i>	+++++++
Testigo (Agua)	B - III	<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Chlamydomonas</i>	++++
Testigo (Agua)	B - IV	<i>Chlamydomonas</i>	++++
		<i>Chlorococcum</i>	++
Testigo (Agua)	B - V	<i>Chlorella</i>	+++
		<i>Navícula</i>	+++++++
Inoculado con consorcio	C - 75 I	<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
Inoculado con consorcio	C - 75 II	<i>Navícula</i>	+++++++
Inoculado con consorcio	C - 75 III	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++
Inoculado con consorcio	C - 75 IV	<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Chlorella</i>	+++
Inoculado con consorcio	C - 75 V	<i>Geitlerinema</i>	+++++
		<i>Chlamydomonas</i>	+++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++
Inoculado con consorcio	C - 150 I	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Acinetos de Anabaena</i>	+++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++++
Inoculado con consorcio	C - 150 II	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Chlorella</i>	++++
		<i>Acinetos de Anabaena</i>	+++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
Inoculado con consorcio	C - 150 III	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++
Inoculado con consorcio	C - 150 IV	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Acinetos de Anabaena</i>	+++++++
Inoculado con consorcio	C - 150 V	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Chlorella</i>	+++
Inoculado con consorcio	C - 300 I	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++
Inoculado con consorcio	C - 300 II	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++
		<i>Navícula</i>	+++++++


 Continúa

Inoculado con consorcio	C - 300 III	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Chlamydomonas</i>	+++++
		<i>Chlorella</i>	++++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++++
Inoculado con consorcio	C - 300 IV	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++
		<i>Chlorella</i>	++++
Inoculado con consorcio	C - 300 V	<i>Calothrix</i>	+++++++
		<i>Navícula</i>	+++++
		<i>Chlorella</i>	+++
		<i>Geitlerinema</i>	+++++
Sobrenadante	SC - I	<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Chlorococcum</i>	++
Sobrenadante	SC - II	<i>Chlorella</i>	+++
		<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Chlorococcum</i>	++
Sobrenadante	SC - III	<i>Navícula</i>	+++++++
		<i>Chlamydomonas</i>	+++++
Sobrenadante	SC - IV	<i>Chlamydomonas</i>	++++
		<i>Chlorococcum</i>	+
Sobrenadante	SC - V	<i>Chlorella</i>	+++
		<i>Navícula</i>	+++++

Figura 45: Número de taxa de microalgas y cianobacterias en función del tratamiento al noveno día de experimento.

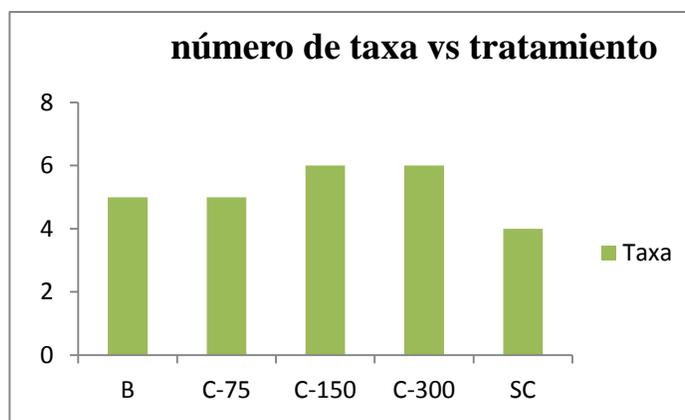


Figura 46: Equivalente numérico de las cruces por taxa presente en los tratamientos al día 9.

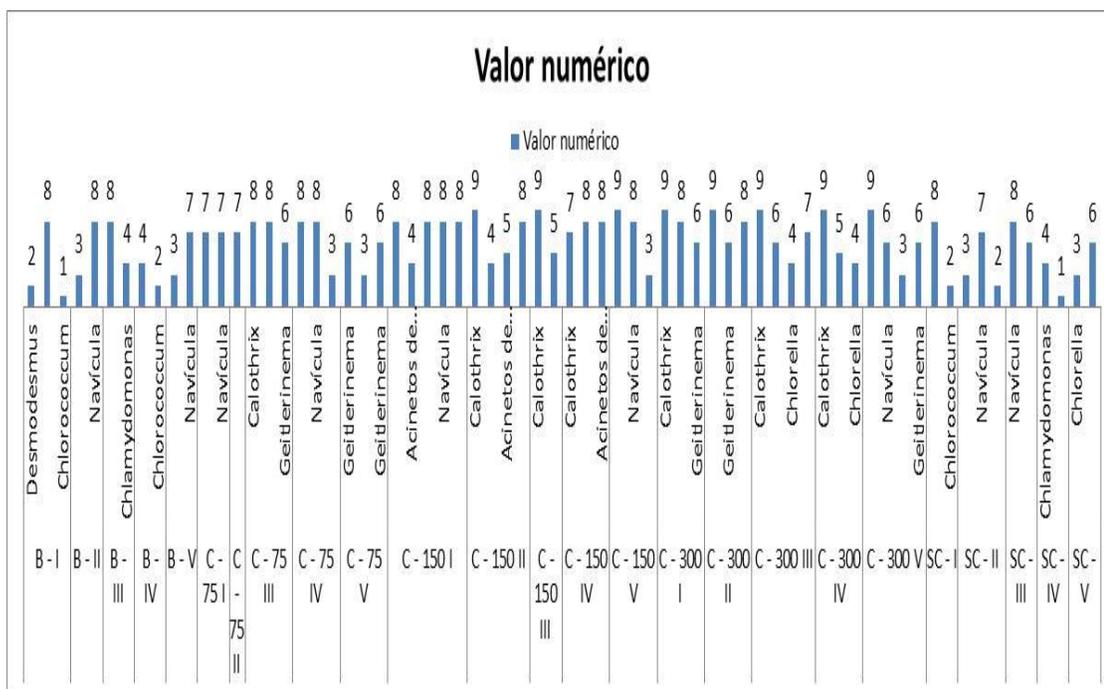


Figura 47: Equivalente numérico de las cruces por taxa presente en los tratamientos al día 6.

3.5.3 Acondicionamiento de suelo

➤ pH

El pH evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la (tabla 3.11), se realizó un análisis de varianza de un factor y se evidenció un valor ($p < 0.05$) que evidencia una diferencia estadística significativa para las medias del pH, debido al efecto de cada tratamiento.

Tabla 21: Valores de pH obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos y el blanco B.

Tratamiento	B	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	7.6	7.3	7.9	8	7.5

Tabla 22: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de pH.

RESUMEN							
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
1	4	4	3.5	1.6666			
		3		66667			
7.6	4	0.7	7.675	0.1091			
				66667			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	34.8	1	34.861	39.261	0.0007	5.9873	
Dentro de los grupos	6125	25	245	8489	67319	77607	
	5.32	6	0.8879				
	75	16667					
Total	40.1	7					
	8875						

Se encontró una variabilidad con respecto al pH en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.20).

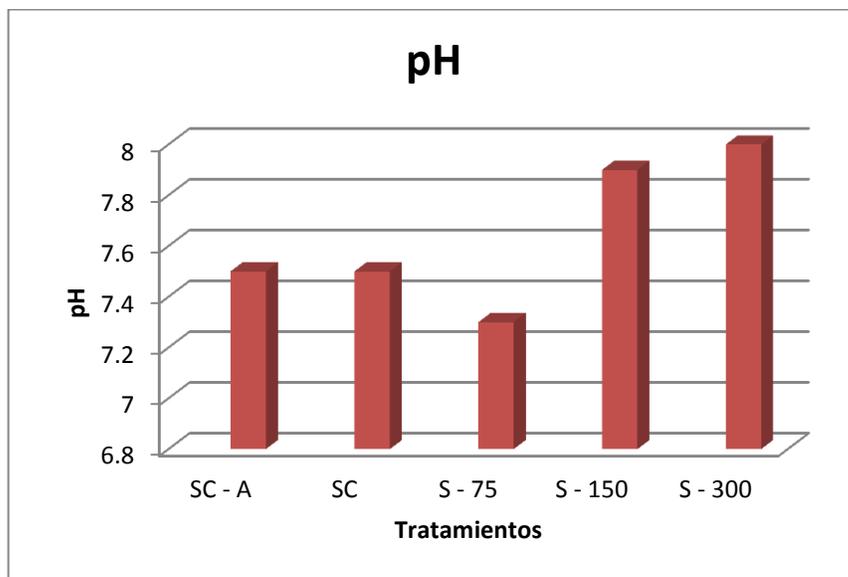


Figura 48: Gráfico de los valores de pH obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

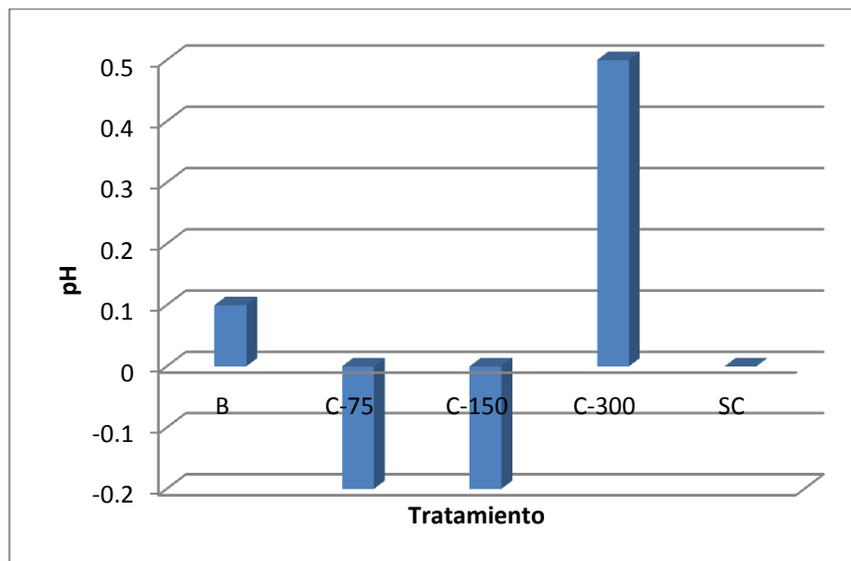


Figura 49: Gráfico de residuos, valores de pH obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Materia Orgánica**

La M. O evaluada en los diferentes tratamientos presenta un valor $p > 0.005$ por tanto no se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.15).

Tabla 23: Valores de M. O obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	2.98	2.78	2.93	3.24	3.19

Tabla 24: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de M. O.

RESUMEN							
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
1	4	14	3.5	1.6			
2.93	4	10.9	2.7325	0.1			
		3		91825			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	1.17	1	1.17811	1.2	0.3031	5.9873	
Dentro de los grupos	81125	6	0.92924	67816	88317	77607	
Total	5475	7	5833				
	6.75						
	35875						

Se encontró una variabilidad con respecto a la M. O en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.22).

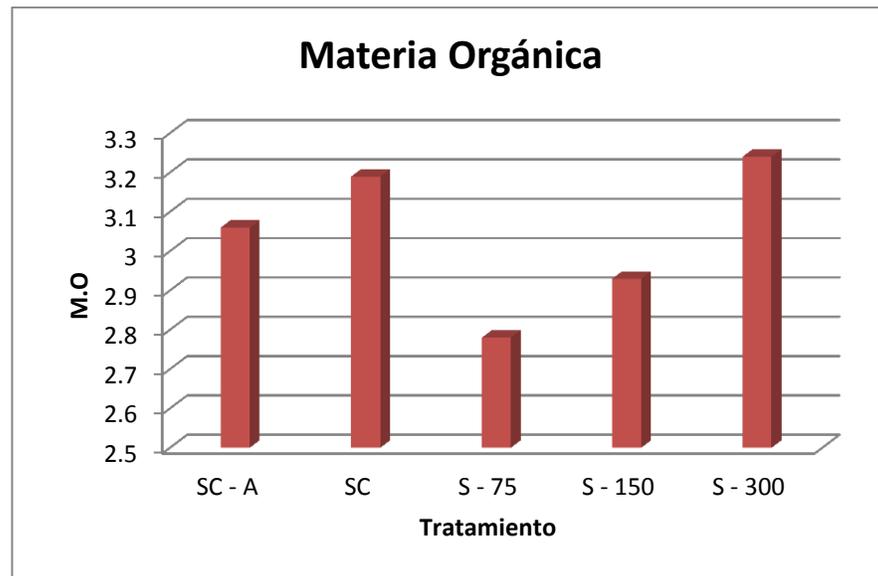


Figura 50: Gráfico de los valores de M. O obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

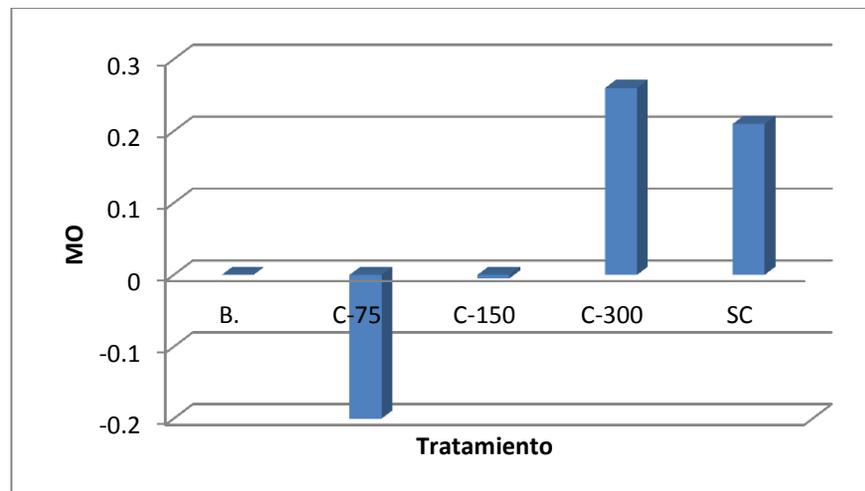


Figura 51: Gráfico de residuos, valores de M. O obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Amoniaco**

El amoniaco evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.17).

Tabla 25: Valores de NH_4 obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	3	39.3	36.8	41.8	39.3

Tabla 26: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de NH_4 .

RESUMEN							
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza			
1	4	14	3.5	1.666			
		15		66667			
43	4	7.2	39.3	4.166			
				66667			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	256	1	2563.28	878.8	9.7682	5.987	
Dentro de los grupos	3.28	6	2.91666	38857	9E-08	37761	
Total	17.5	7	2.51666				
	258						
	0.78						

Se encontró una variabilidad con respecto al NH_4 en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.23).

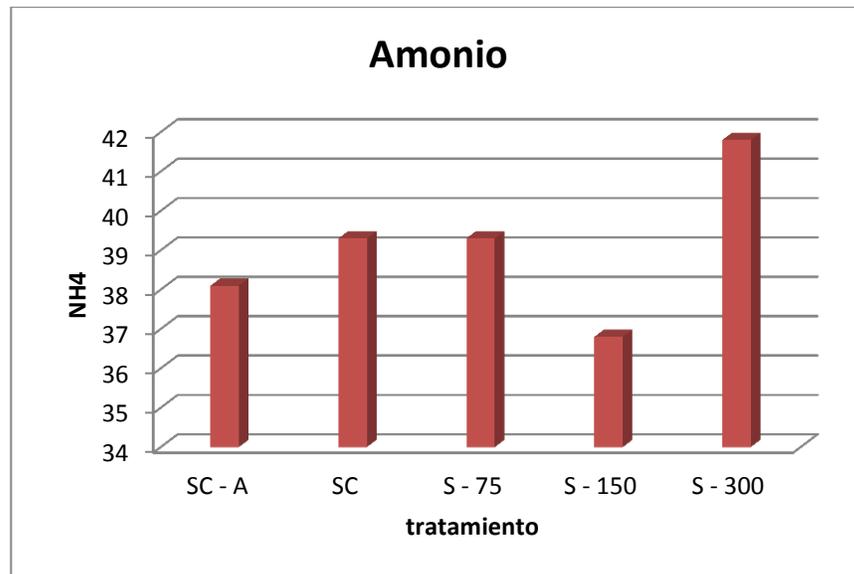


Figura 52: Gráfico de los valores de NH₄ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

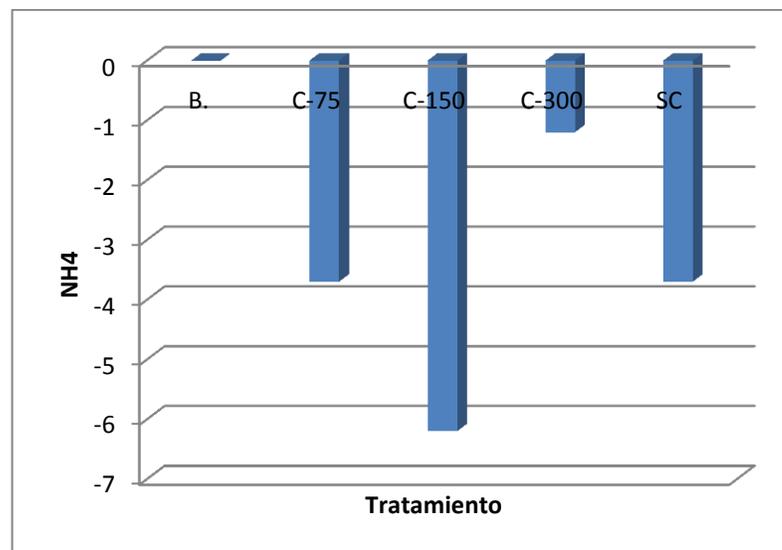


Figura 53: Gráfico de residuos, valores de NH₄ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Nitrato**

El nitrato evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.19).

Tabla 27: Valores de NO_3 obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	182.1	150.4	115.4	94.5	151.8

Tabla 28: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de NO_3 .

RESUMEN						
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	216.3	-54.075	783.0		
1	4	14	3.5	66667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6629.76	1	6629.76	16.89	0.0062	5.987
Dentro de los grupos	76125.917	6	12687.653	67975	8233	37761
Total	8983.683	7				

Se encontró una variabilidad con respecto al NO_3 en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.24).

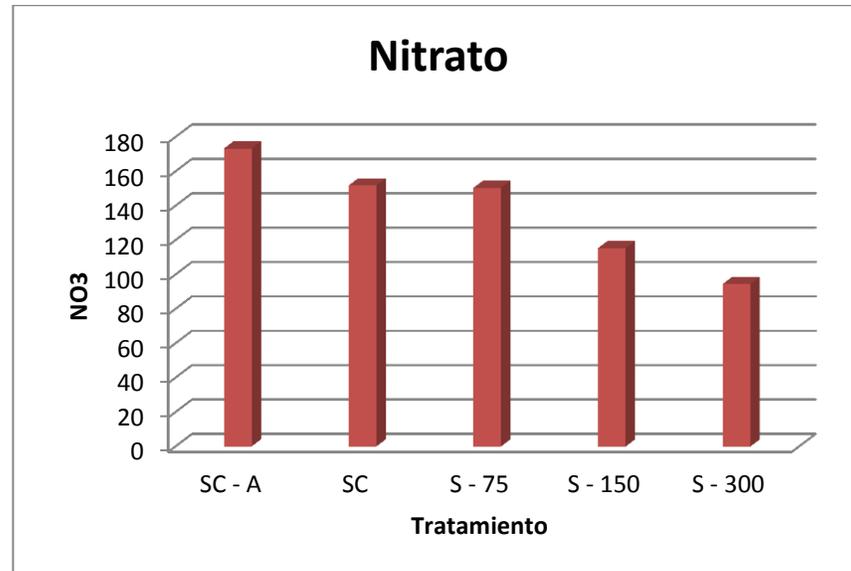


Figura 54: Gráfico de los valores de NO₃ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

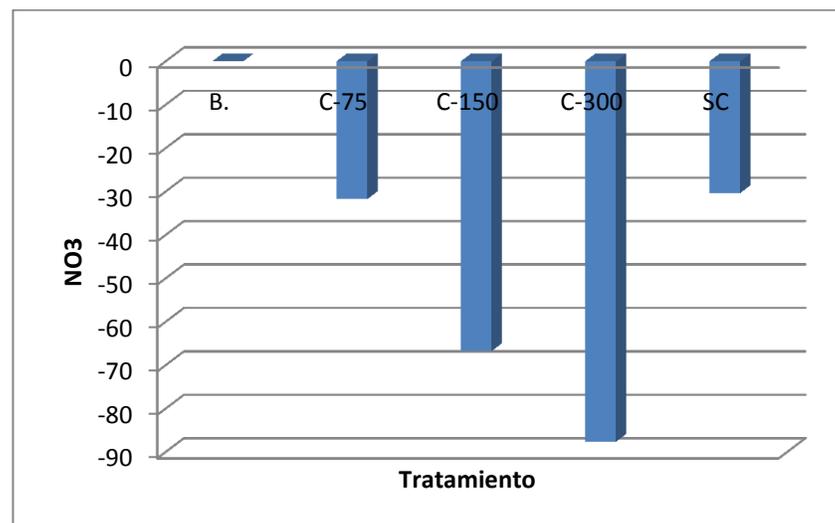


Figura 55: Gráfico de residuos, valores de NO₃ obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Fósforo**

El fósforo evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.21).

Tabla 29: Valores de P obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	10	109	107	102	11

Tabla 3. 1: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de P.

RESUMEN							
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
0	4	216.3	-54.075	783.0 69167 1.666			
1	4	14	3.5	66667			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Prueba de probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	6629.76125	1	6629.76125	16.89	0.0062	5.987	
Dentro de los grupos	2354.2075	6	392.3679	67975	8233	37761	
Total	8983.96875	7					

Se encontró una variabilidad con respecto al P en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.25).

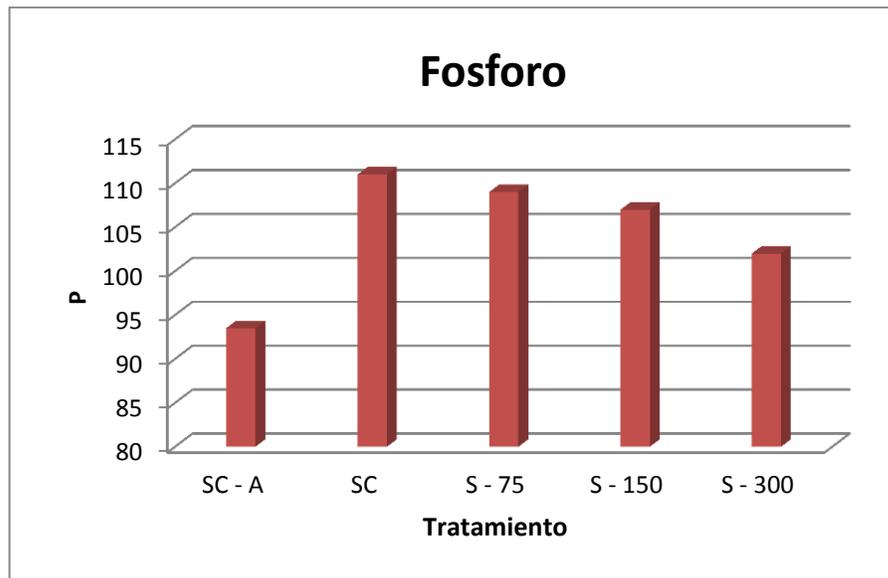


Figura 56: Gráfico de los valores de P obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

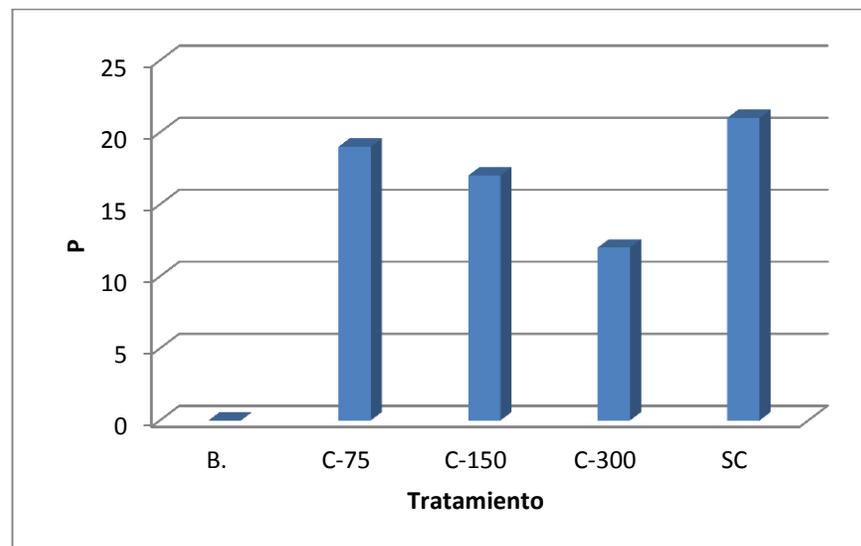


Figura 57: Gráfico de residuos, valores de P obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Potasio**

El potasio evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.23).

Tabla 3. 2: Valores de K obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	0.57	0.54	0.66	0.61	0.63

Tabla 3. 3: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de K.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	0.16	0.04	0.0026		
1	4	14	3.5	1.66666667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	23.9432	1	23.9432	28.6870881	0.0017	5.98737761
Dentro de los grupos	5.0078	6	0.8346333			
Total	28.951	7				

Se encontró una variabilidad con respecto al P en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.26).

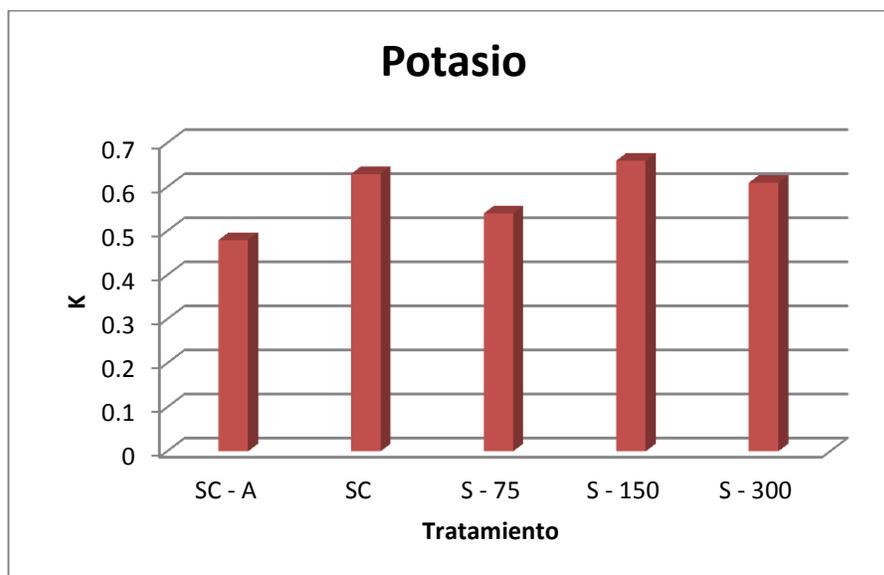


Figura 58: Gráfico de los valores de K obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

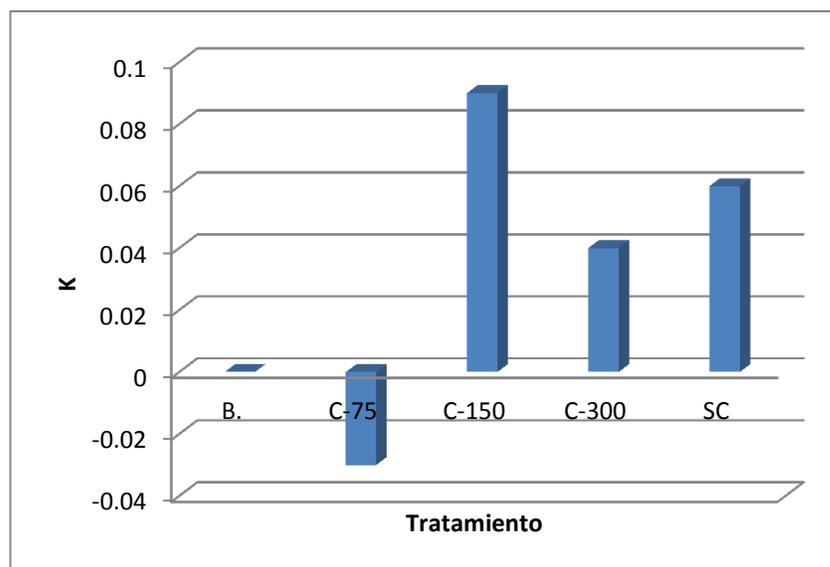


Figura 59: Gráfico de residuos, valores de K obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Calcio**

El calcio evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.25).

Tabla 30: Valores de Ca obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	15.01	13.62	15.12	14.88	14.7

Tabla 31: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Ca.

RESUMEN						
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	1.72	-0.43	0.4392		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	30.8898	1	30.8898	29.3369001	0.00163841	5.98737761
Dentro de los grupos	6.3176	6	1.05293333			
Total	37.2074	7				

Se encontró una variabilidad con respecto al Ca en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.27).

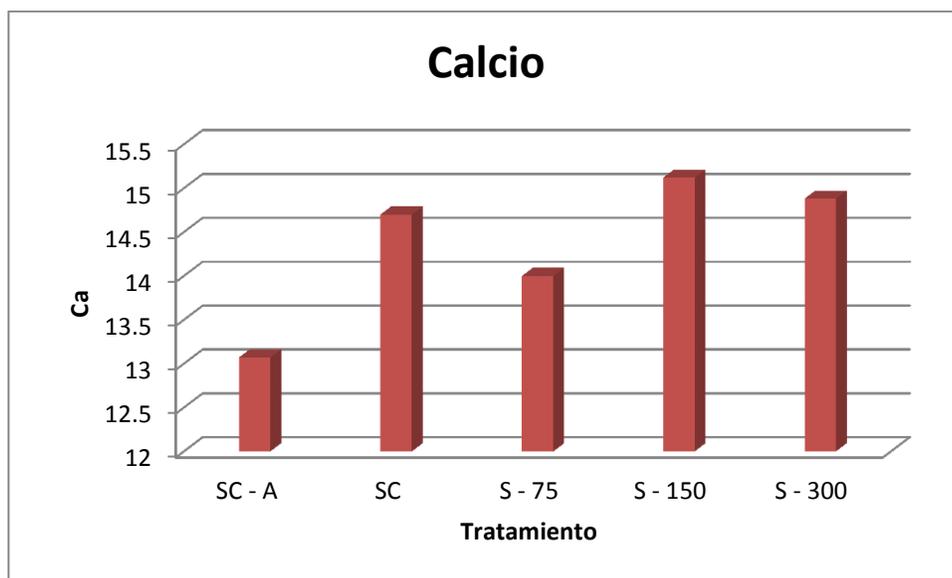


Figura 60: Gráfico de los valores de K obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

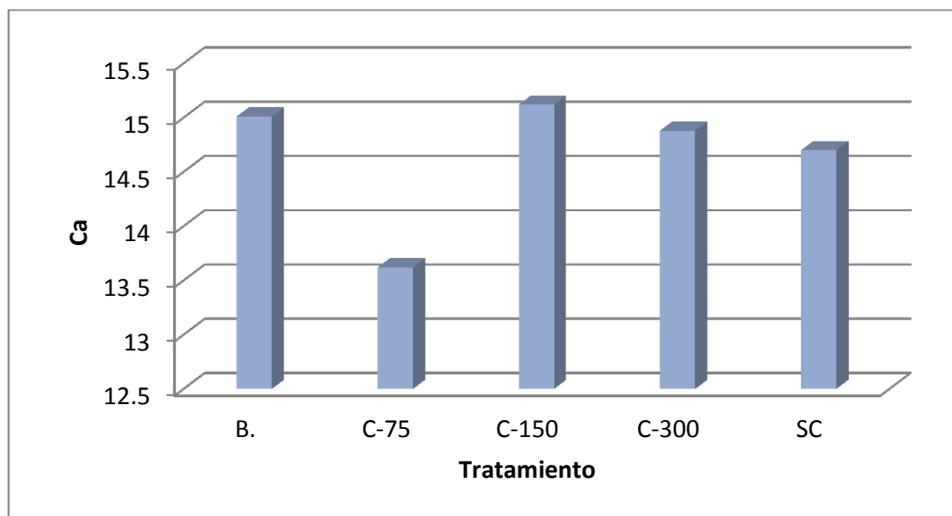


Figura 61: Gráfico de residuos, valores de Ca obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Magnesio**

El magnesio evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.27).

Tabla 32: Valores de Mg obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	4.36	4.21	4.25	4.13	4.06

Tabla 33: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Mg.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	-0.79	-0.1975	0.007	15833	
1	4	14	3.5	1.666	66667	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	27.34	1	27.343012	32.67	0.0012	5.987
Dentro de los grupos	30125	6	0.8369125	12918	4218	37761
Total	32.36	7				
	44875					

Se encontró una variabilidad con respecto al Mg en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.28).

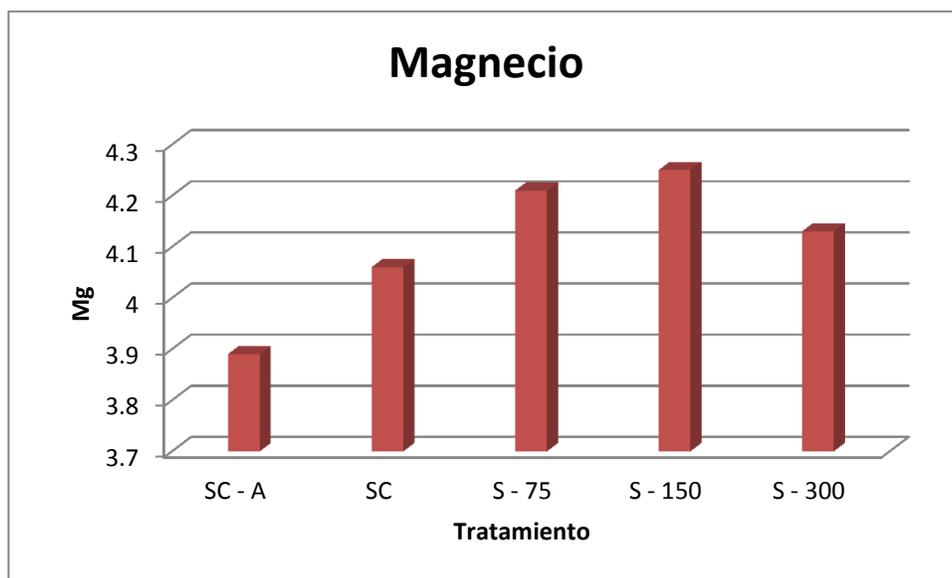


Figura 62: Gráfico de los valores de Mg obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

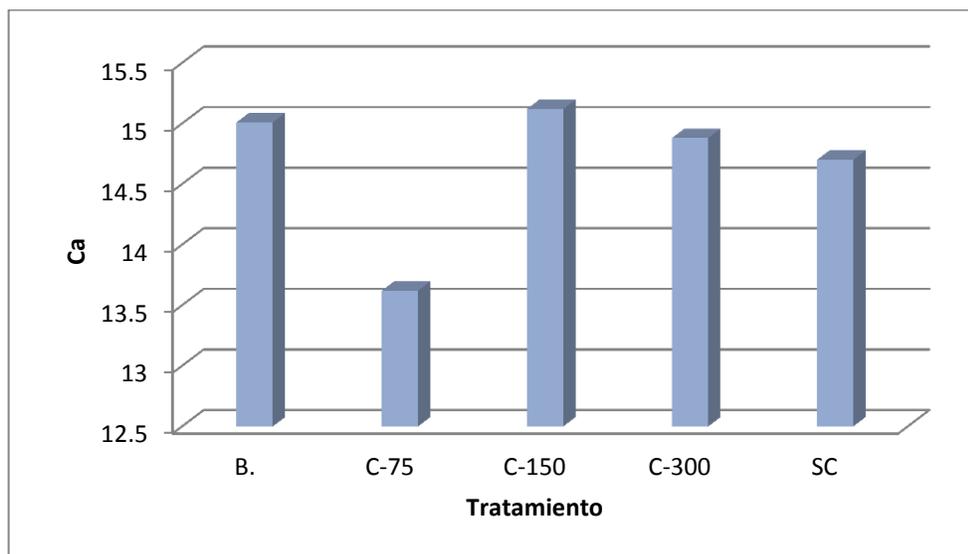


Figura 63: Gráfico de residuos, valores de Mg obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos

➤ **Sodio**

El sodio evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.29).

Tabla 34: Valores de Na obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	0.75	0.85	0.65	0.6	0.75

Tabla 35: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Na.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	0.15	-0.0375	0.012	29167	1.666
1	4	14	3.5	66667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	25.02	1	25.027	29.81	0.0015	5.987
Dentro de los grupos	78125	6	8125	35004	7232	37761
Total	30.06	7	0.8394	7917		

Se encontró una variabilidad con respecto al Na en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.29).

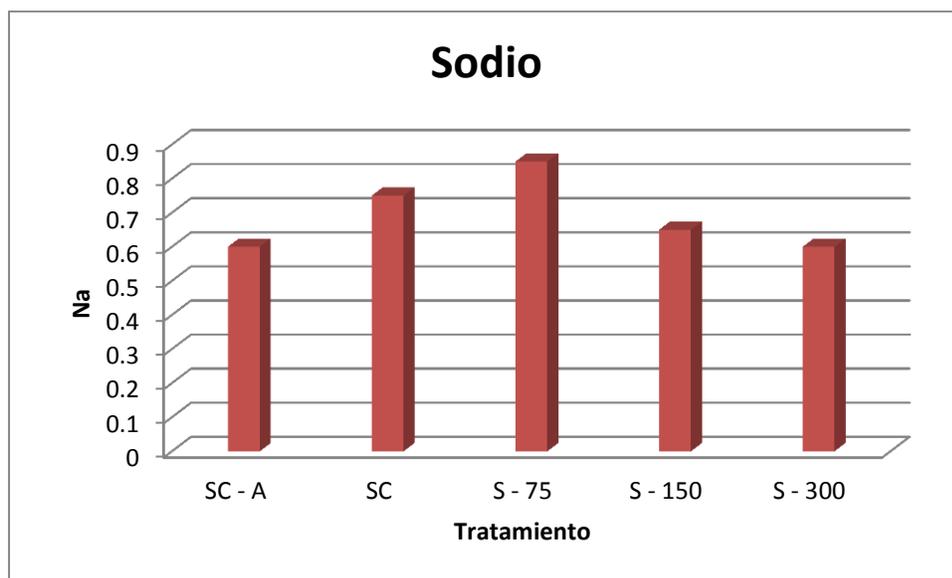


Figura 64: Gráfico de los valores de Na obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

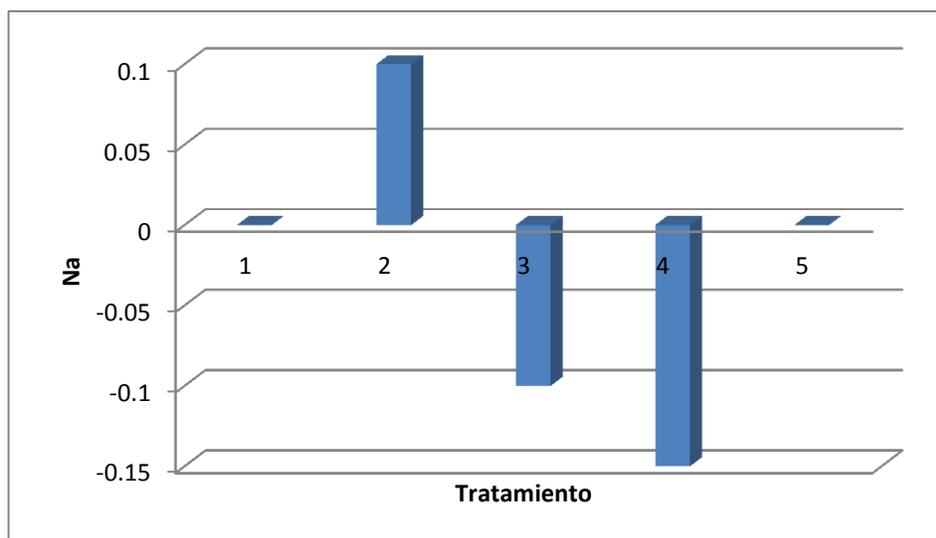


Figura 65: Gráfico de residuos, valores de Na obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Aluminio**

El aluminio evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.31).

Tabla 36: Valores de Al obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	0.44	0.48	0.55	0.46	0.5

Tabla 37: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Al.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	0.23	0.0575	49167	1.666	66667
1	4	14	3.5			
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Prueba de probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	23.70	1	23.7016	28.41	0.0017	5.987
Dentro de los grupos	5.004475	6	0.83407917	65022	7693	37761
Total	28.7060875	7				

Se encontró una variabilidad con respecto al Al en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.30).

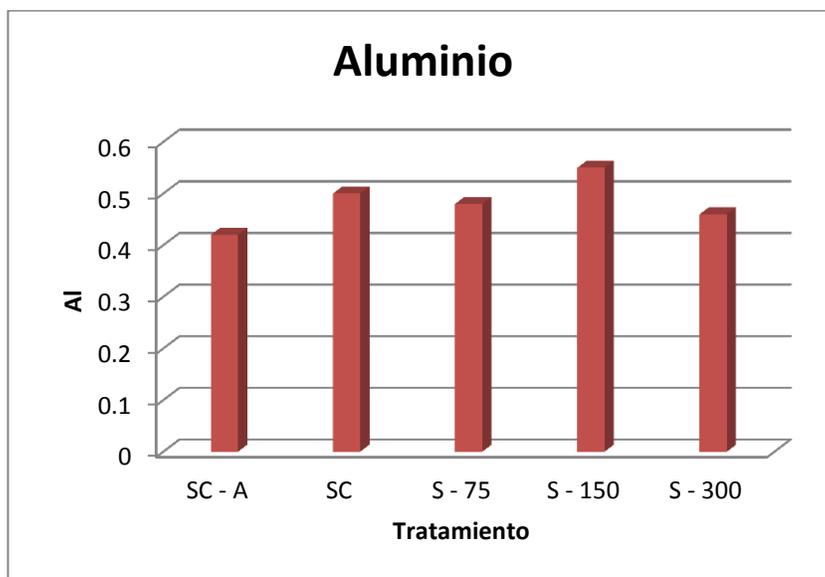


Figura 66: Gráfico de los valores de Al obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

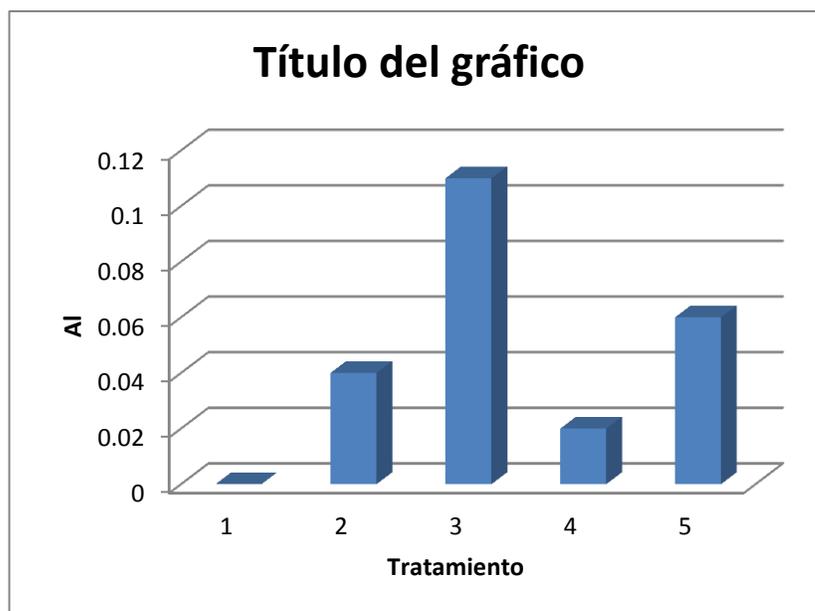


Figura 67: Gráfico de residuos, valores de Al obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos

➤ **Cobre**

El Cu evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.33).

Tabla 38: Valores de Cu obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	5.6	5.5	5.6	5.9	5.2

Tabla 39: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Cu.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	-0.2	-0.05	0.083		
1	4	14	3.5	33333		
				1.666		
				66667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	25.205	1	25.205	28.80	0.0017	5.987
Dentro de los grupos	5.25	6	0.875	57143	1652	37761
Total	30.455	7				

Se encontró una variabilidad con respecto al Cu en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.31).

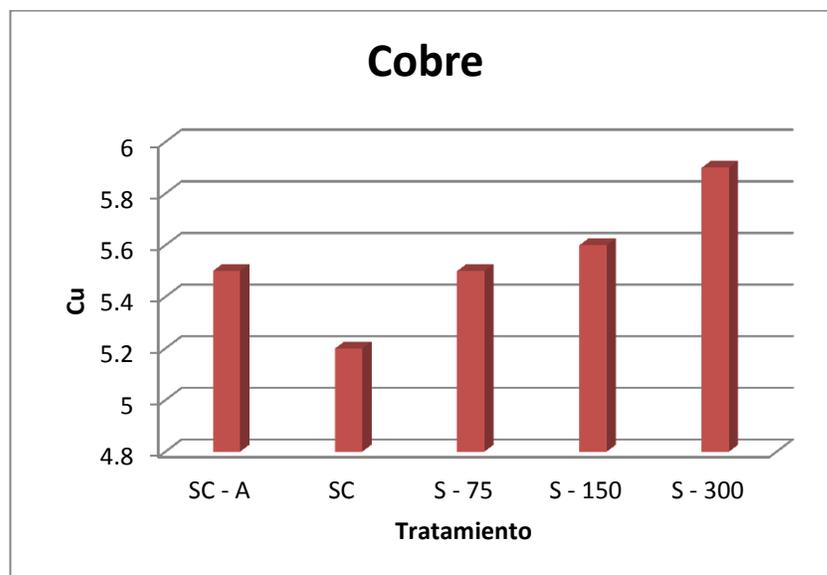


Figura 68: Gráfico de los valores de Cu obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

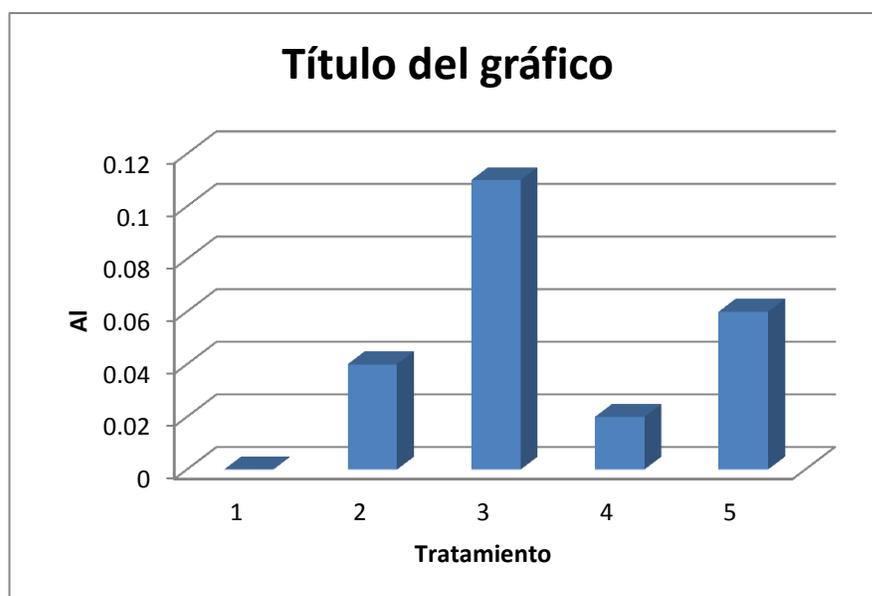


Figura 69: Gráfico de residuos, valores de Cu obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Hierro**

El Fe evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.35).

Tabla 40: Valores de Fe obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	48.7	58.7	48.9	50.6	46.3

Tabla 41: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Fe.

RESUMEN						
Grupos	Cue nta	Su ma	Promedi o	Varianza		
0	4	9.7	2.425	28.62 91667		
1	4	14	3.5	1.666 66667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.31 125	1	2.31125	0.152 57874	0.7095 7507	5.987 37761
Dentro de los grupos	90.8 875	6	15.1479 167			
Total	93.1 9875	7				

Se encontró una variabilidad con respecto al Fe en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.32).

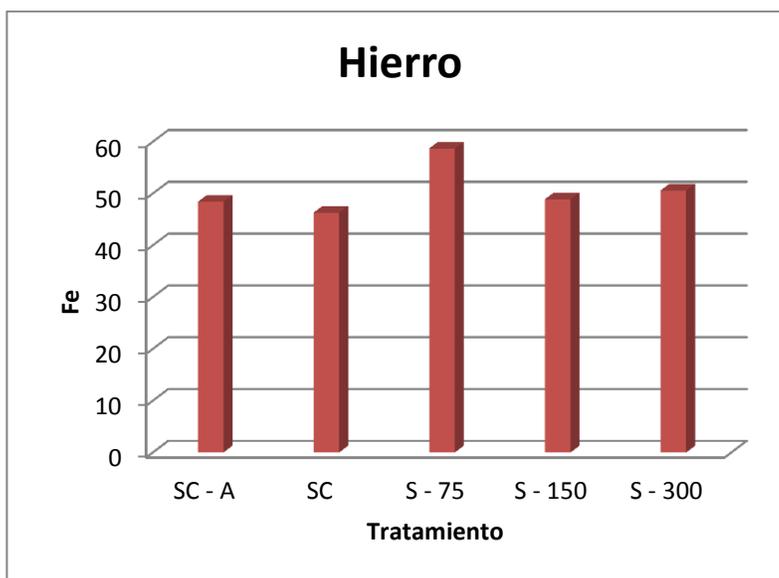


Figura 70: Gráfico de los valores de Fe obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

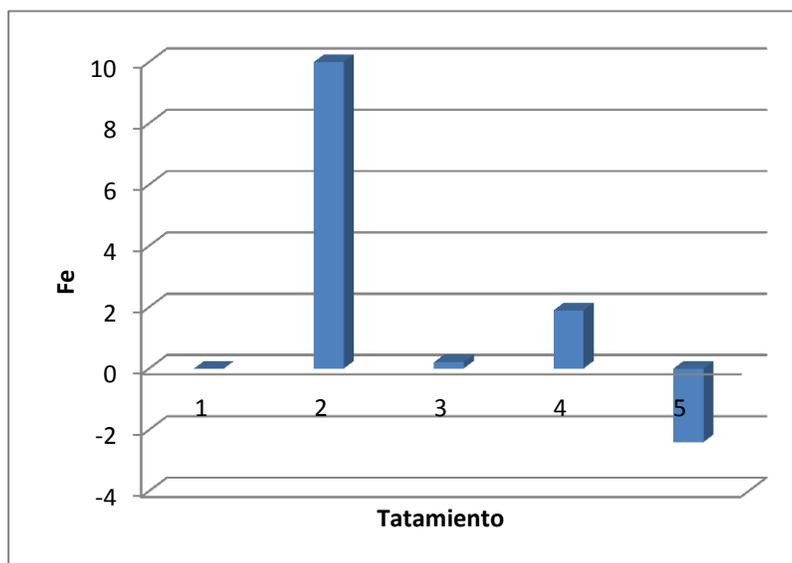


Figura 71: Gráfico de residuos, valores de Fe obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Manganeso**

El Mn evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.37).

Tabla 42: Valores de Mn obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	4.2	4.2	4.5	5.2	4.3

Tabla 43: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Mn.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	14	0.35	0.203		
1	4	14	3.5	33333		
				1.666		
				66667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	19.845	1	19.845	21.22	0.0036	5.987
Dentro de los grupos	5.61	6	0.935	45989	6492	37761
Total	25.455	7				

Se encontró una variabilidad con respecto al Mn en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.33).

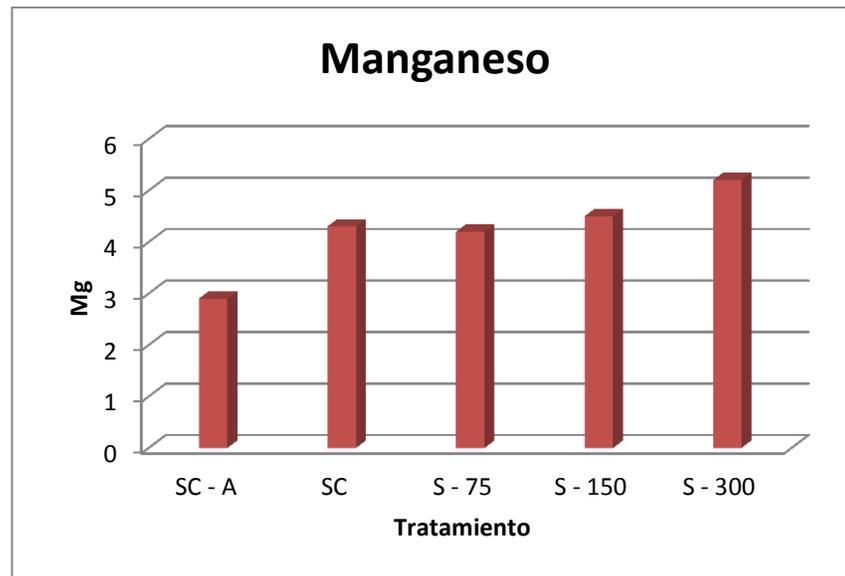


Figura 72: Gráfico de los valores de Mn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

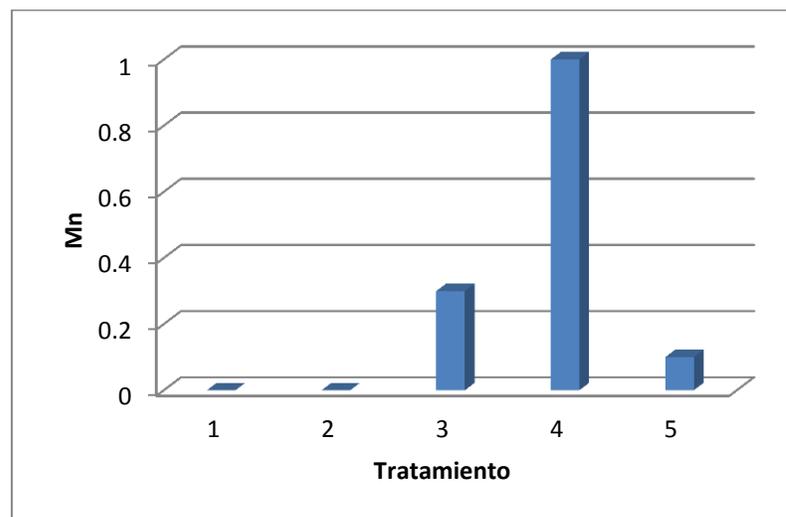


Figura 73: Gráfico de residuos, valores de Mn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Zinc**

El Zn evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.39).

Tabla 44 Valores de Zn obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Parámetro	SC - A	SC	S - 75	S - 150	S - 300
Zn (ppm)	11.8	11.4	12.2	11.5	11.9

Tabla 45: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de Zn.

RESUMEN							
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
0	4	-7	-1.75	0.136			
		1		66667			
1	4	4	3.5	1.666			
				66667			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Prueba de probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	55.1	1	55.12	61.13	0.0002	5.987	
Dentro de los grupos	25	6	0.901	67837	3096	37761	
Total	60.5	7					
	35						

Se encontró una variabilidad con respecto al Zn en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.34).

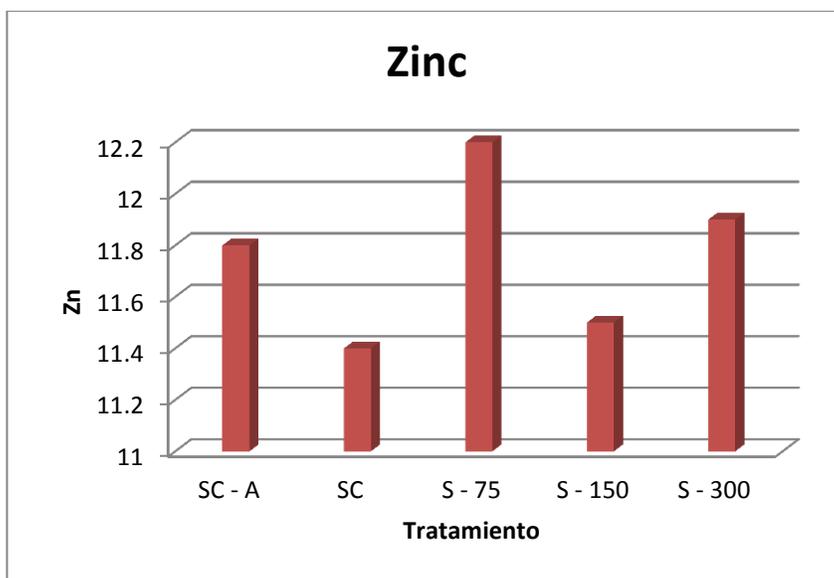


Figura 74: Gráfico de los valores de Mn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

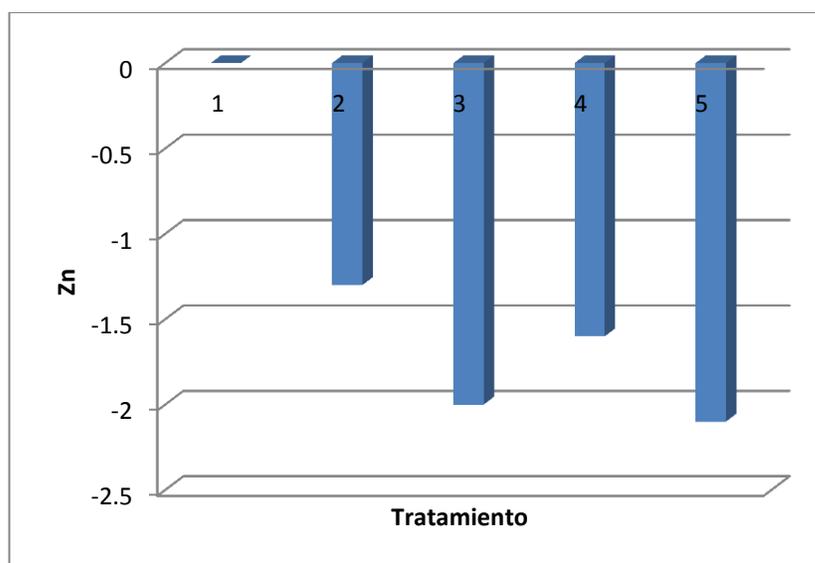


Figura 75: Gráfico de residuos, valores de Zn obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Boro**

El B evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p < 0.005$ por tanto se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.41).

Tabla 46: Valores de B obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	4.4	4.56	3.35	3.12	3.67

Tabla 47: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de B.

RESUMEN							
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
0	4	2.9	-0.725	0.398	96667	1.666	66667
1	4	14	3.5				
ANÁLISIS DE							
VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	35.70125	1	35.70125	34.5668802	0.00107272	5.987	37761
Dentro de los grupos	6.19667	6	1.03281667				
Total	41.89815	7					

Se encontró una variabilidad con respecto al B en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.35).

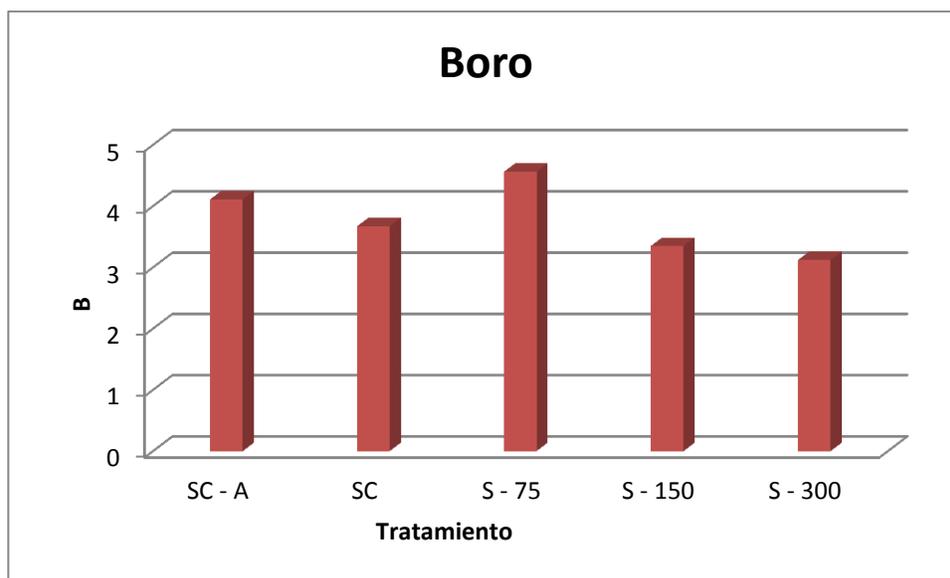


Figura 76: Gráfico de los valores de B obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

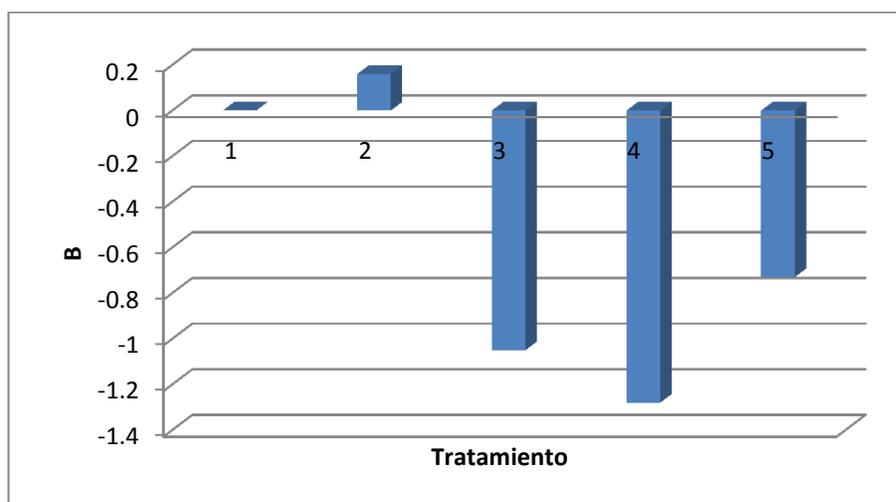


Figura 77: Gráfico de residuos, valores de B obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

➤ **Sulfato**

El SO_4 evaluado en los diferentes tratamientos presenta un valor $p > 0.005$ por tanto no se evidencia una diferencia estadística significativa debido al efecto de cada tratamiento (tabla 3.41).

Tabla 48: Valores de SO_4 obtenidos en el análisis químico de los suelos con los diferentes tratamientos, sobrenadante (SC) y blanco (B).

Tratamiento	B.	C-75	C-150	C-300	SC
Suelo	36.4	44.1	41	38.7	34.7

Tabla 49: Análisis de varianza de un factor para determinar el efecto de los tratamientos en el valor de SO_4 .

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0	4	12.9	3.225	15.67		
1	4	14	3.5	58333		
				1.666		
				66667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.15	1	0.15125	0.017	0.8992	5.987
Dentro de los grupos	52.0	6	8.67125	4427	4589	37761
Total	52.1	7				
	7875					

Se encontró una variabilidad con respecto al SO_4 en los diferentes tratamientos como se observa en la (figura 3.36).

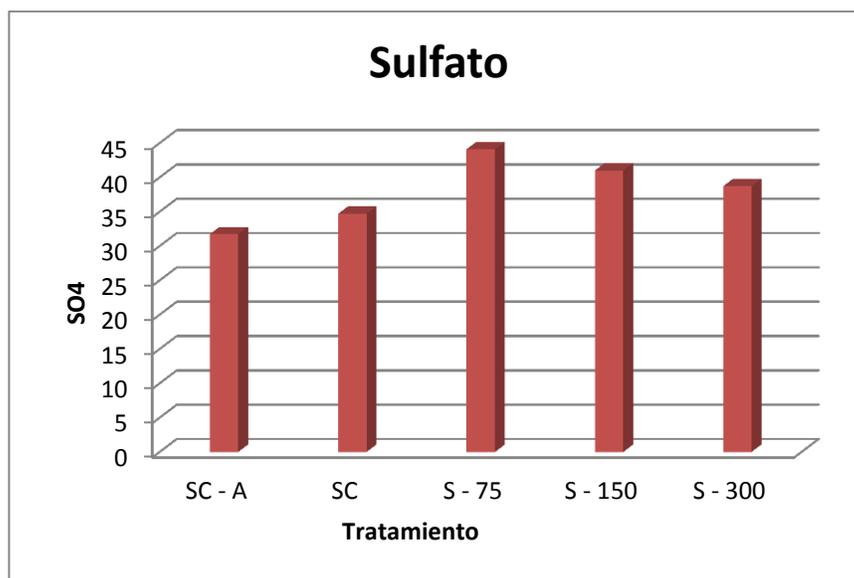


Figura 78: Gráfico de los valores de SO_4 obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

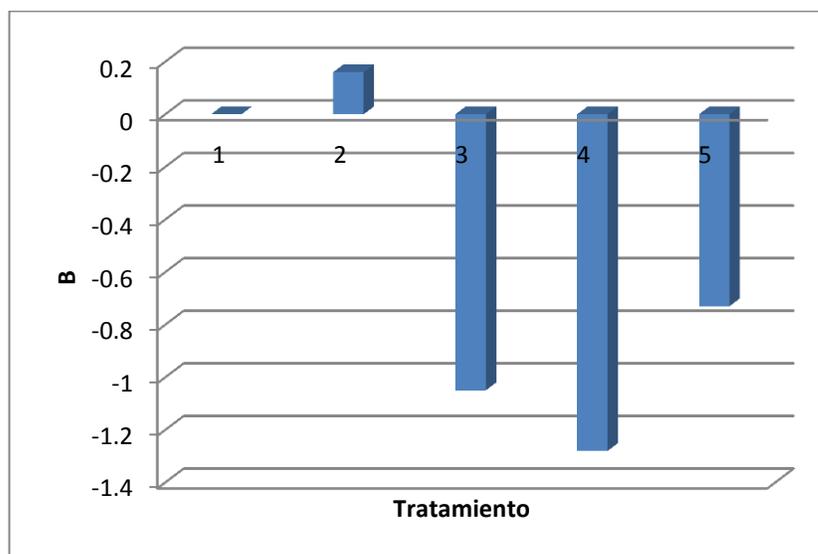


Figura 79: Gráfico de residuos, valores de SO_4 obtenidos del análisis de los suelos con los distintos tratamientos.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En este estudio se demostró el efecto de cuatro medios de cultivo deferentes sobre el crecimiento de un consorcio de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix sp.* basado en la fotosíntesis y su capacidad de fijación de N_2 . Se evaluó la viabilidad del consorcio a concentraciones de 3 mL y 6 mL de extracto de suelo, se determinó la eficiencia del medio BG11₀ en el aislamiento de *Calothrix sp.* y su predominio en los diferentes ensayos, se analizó la producción de exopolisacáridos, viabilidad y capacidad acondicionante al ser aplicado en suelo.

A partir de las muestras obtenidas de la parroquia La Paz de Conocoto, se logró aislar las cianobacterias *Calothrix sp.*, *Leptolyngbya sp.* y *Anabaena* de las cuales 2 presentan heterocistos, como evidencia de ser fijadoras de nitrógeno corresponden *Calothrix sp.* y *Anabaena sp.*

En todos los tratamientos realizados (medio de cultivo BG11₀, medio BG11₀ + 1 ml de NO_3Na (2mM), medio BG11₀ + 1 ml extracto de suelo, medio BG11₀ + 1 ml extracto de suelo + 1 ml de NO_3Na (2mM)) se mantuvo el crecimiento de cianobacterias *Anabaena sp.* *Leptolyngbya sp.* con predominio de *Calothrix sp.*; El uso del medio BG11₀ contribuyó de manera eficiente a la proliferación de estas cianobacterias fijadoras de nitrógeno y condicionó el desarrollo de la microalga *Chlorella* debido a que este medio no contiene

fuentes de nitrógeno (nitrato de sodio, NaNO_3) con la finalidad de promover la fijación del N_2 por el consorcio (Abalde, 1995).

Con respecto a la concentración de biomasa en los cuatro ensayos que se estudiaron, se aprecia una importante significancia del medio de cultivo que se utilizó. Los mejores resultados se obtuvieron para el medio BG11₀ + S, las causas apuntan directamente a la composición del medio pues presenta silicato que es un componente que contribuye al crecimiento y desarrollo de cianobacterias (Radach, 1990).

Se determinó que 3 mL de extracto de suelo permiten el desarrollo óptimo de cianobacterias y una alta producción de acinetos de *Anabaena sp.* Radach, 1990. Cuando se añade al estanque una combinación de nitrógeno, fósforo y carbono, las cianobacterias crecen significativamente más. Sin embargo, en algunos experimentos se ha observado que el crecimiento de las diatomeas en estos sistemas pudiera llegar a cesar cuando el abastecimiento de sílice se agota y entonces otras clases de fitoplancton (las cuales son en su mayoría tóxicas) pueden continuar proliferando utilizando el exceso de nitrógeno y fósforo.

Por el contrario la adición de 6 mL de extracto de suelo hace que disminuya drásticamente la población de *Calothrix sp.* y *Anabaena sp.* Singer y Munns, 1996, y Paul *et al.*, 1999. En el suelo se produce la ruptura de grandes moléculas mediante la acción de enzimas liberadas por algunos hongos y bacterias debido a la asimilación y transformación de los productos solubles

generados a través de los microorganismos del suelo en situación de stress. Los productos secundarios del metabolismo de los organismos y de la ruptura de grandes moléculas se acumulan como una sustancia coloidal compleja que inhibe el desarrollo de otros microorganismos. También se debe tomar en cuenta que el desarrollo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno se ve interrumpido si existe interferencia en la actividad del complejo de la nitrogenasa la cual es inhibida por la presencia de formas reducidas de nitrógeno en el ambiente, La presencia de altas concentraciones de amoníaco, nitrato, urea y ciertos aminoácidos inhiben la actividad de la nitrogenasa, el grado de inhibición que causan los últimos tres depende de la facilidad con que un organismo en particular pueda convertirlos a amoníaco.

En el segundo ensayo se constató la presencia de polisacárido capsulares donde la capa mucilaginoso se observa clara en contraste con el fondo oscuro permitiendo diferenciar la estructura de *Calothrix sp.*, un rasgo típico de especies terrestres que lo emplean principalmente como un mecanismo efectivo de retención de agua que las protege de condiciones ambientales desfavorables (De Philippis et al., 2000). También se produce por bajas concentraciones de fosfatos (Hay y col., et al., 1999).

Diversos estudios demuestran que las microalgas y cianobacterias tiene la capacidad de modular la producción tanto exopolisacáridos como de endopolisacáridos en respuesta a diversos factores ambientales como el estrés salino, desecación, altas irradiancias y deficiencia de nitrato, también

como mecanismo de protección de las células y además contribuye a proteger a las células de la predación por protozoarios y efecto de agentes antibacterianos, detergentes, etc. Asimismo de proveer la capacidad de formar biopelículas en superficies sólidas (Lupi y col., *et al.*, 1994).

En todos los medios de cultivo existió el predominio de la cianobacteria *Calothrix sp.* y con el tiempo fue apareciendo un tipo de cianobacteria no fijadora de nitrógeno denominada *Geitlerinema sp.*, el predominio de *Calothrix sp.* pudo deberse a varios factores entre ellos la actividad de lipopolisacáridos (LPS) que forman parte de la pared externa y como todos los Gram negativos pueden afectar a otros organismos incapacitando defensas.

Al existir producción de exopolisacáridos en todos los cultivos, posiblemente debió existir escasez de nitrógeno en el medio, debido a que estas condiciones de diazotrofia estimulan la síntesis y liberación de exopolisacáridos solubles y capsulares tal como ha sido descrito en *Limnothrix sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Nostoc LAUN 0015*, *Phormidium sp.*, y en *Cyanothece* (De Philippis et al ., 1993). Posiblemente, la capacidad fijadora de nitrógeno que presenta *Calothrix sp.*, sea un factor importante para incrementar su eficiencia en cuanto a su crecimiento a bajos niveles de nitrato en comparación a las otras cianobacterias carentes de heterocistos.

Sheridan, 2001. Las matas de las poblaciones de cianobacteriales fijadoras de nitrógeno establecidas como epilíticas tienen adaptaciones en su estructura que les permite sobrevivir. Esta habilidad podría explicar la sucesión en los

cultivos algales establecidos, donde primero creció *Phormidium* sp. posteriormente en los cultivos viejos (1 año) con escasez de nutrientes inicio su etapa senescente exhibiendo talos blanquecinos donde prosperaron los filamentos epifíticos parduscos y diazotróficos de *M. testarum*. Este comportamiento sucesional también se presentó en cultivos de las microalgas marinas a partir de un mismo inóculo donde inicialmente prosperó *Lyngbya lutea*, la cual posteriormente entró en etapa senescente y floreció *Calothrix crustacea* cianobacteria heterocistada y diazotrófica, junto con la edad del cultivo también acompaña un especie de *Geitlerinema* (Montoya et al., 2000).

Se conoce que la dominancia de matas cianobacteriales epilíticas como *Calothrix* sp., en las áreas fluctuantes investigadas se puede atribuir a su tolerancia a los estresores en éstos ambientes extremos y a una escasez relativa de predadores y de especies competidoras excluidas por los efectos fluctuantes del hábitat como ha sido indicado por Whitton & Potts (1982). *Calothrix* sp., es una cianobacteria filamentosa, estudios han determinado que en cianobacterias con mayor proporción de superficie / volumen tienen mejor potencial para las velocidades de absorción de nutrientes, siendo que una cepa con mayor tamaño celular tiene mejor capacidad para la diferenciación interna y por consiguiente es más exitosa en una variedad de condiciones de crecimiento, las características morfológicas de las cianobacterias pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales (Paasche, 1960; Fogg, 1975).

Potts & Whitton, 1979. Sostienen que numerosos géneros de cianofitas son capaces de sobrevivir a la desecación. Paerl, 1988. *Calothrix sp.*, es fundamentalmente epifítico y epilítico, pudiendo ser planctónico, destacan *Calothrix parietina* y *Tolypothrix distorta* y, en menor medida, *Nostoc commune*. En numerosos trabajos se ha mencionado la abundancia de estas especies en la zona sublitoral de lagos oligotróficos con déficit de nitrógeno. Pero, parece que la principal razón de su importancia en este embalse es, por un lado, la capacidad de producir mucílago y, por otro, la capacidad de producir hormogonios o mantener una vida planctónica (Casco, 1997), lo que les permite resistir en periodos desfavorables y colonizar rápidamente nuevos sustratos pero, cuando las condiciones del aire son secas y cálidas, la comunidad algal desaparece completamente Picket & White (1985).

Los análisis de clorofila y carotenoides mostraron la eficacia del medio BG11₀ con extracto de suelo para la producción de estos pigmentos. Cañizares, 2000. Se conoce que la nutrición mineral afecta parámetros metabólicos y de crecimiento incluyendo el contenido de clorofila en las algas así como las deficiencias de Fe, N y Mg que son constituyentes esenciales del grupo hemo y de la clorofila.

La síntesis de clorofila y su descomposición en el fitoplancton, guarda una estrecha relación con el metabolismo del nitrógeno. Bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, la síntesis de clorofila disminuye y el contenido celular empieza a declinar mientras que los pigmentos carotenoides pueden seguir

sintetizándose por más tiempo para después disminuir a una velocidad mucho menor que la clorofila. Una relación elevada de carotenoides/clorofila en cultivos de algas refleja una deficiencia de nutrientes, la que puede estar correlacionada con una reducción de la capacidad fotosintética de las células (Betancourt, 1997). La baja producción de ficocianina en cultivos carentes o limitantes de nitrógeno obedece a procesos de degradación, a fin de movilizar el nitrógeno de ésta cromoproteína, hacia rutas metabólicas inherentes al crecimiento y síntesis de otras macromoléculas (Lewitus y Caron, 1990). Mientras que la disminución en condiciones de saturación de nitrato como en los cultivos a 12 mM NaNO₃, indican un efecto inhibitorio (Loreto, 2002).

La disponibilidad de nutrientes, los regímenes de luz-oscuros y la tensión del oxígeno en el ambiente juegan un papel importante en la modificación del aparato fotosintético de las cianobacterias (Grossman y col., 1994). Por ejemplo, *Calothrix elenkenii* en cultivos con iluminación continua produjo la cantidad máxima de ficobiliproteínas totales y azúcares, aunque la acumulación de la clorofila y la actividad nitrogenasa eran más altas cuando era cultivada bajo regímenes de luz-oscuridad (Prasanna y col., 2004); Otras investigaciones indican que la síntesis de cianobacterias filamentosas de hábitat preferiblemente bentónicos como *Anabaena sp. PCC7120*, *Pseudanabaena galeata*, *Limnothrix sp*, *Oscillatoria agardhii* y *Spirulina platenses*, presentan un óptimo crecimiento a bajas o moderadas intensidades

luminosas de 78, 25-60, 78-117, 12-95, 49 y 156 $\mu\text{mol}\cdot\text{q}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente (Sivonen, *et al.*, 1990).

En los cultivos también se notó una alta presencia de *Anabaena* sp. lo que demostró su versatilidad fisiológica para adaptarse a medios limitantes o carentes de nitrógeno. Es decir, su crecimiento a bajas concentraciones de nitrato es compensado por su propiedad fijadora de nitrógeno. Esto se evidencia con el incremento de heterocistos a estas condiciones de cultivo, lo cual ha sido reportado en otras cianobacterias filamentosas (Tandeau de Marsac & Houmard 1993). En *Anabaena cilíndrica* el porcentaje de heterocistos puede ser incrementado hasta un 12% cuando es cultivada sólo con nitrógeno atmosférico (Stacey *et al.*, 1977). Mientras que un aumento de la concentración de fuentes nitrogenadas en el medio de cultivo induce un descenso de heterocistos (Mishra 1997).

Dentro de cada especie, los requerimientos también varían en función de las condiciones ambientales como luz, temperatura y pH (Abalde, *et al.*, 1995), es así que los resultados indican diferencias entre cada tipo de cianobacteria para conseguir mayor crecimiento y producción de proteínas; se debe enfatizar que en medio de cultivo carente de nitrato de sodio se observó un importante crecimiento de biomasa en condiciones diazotróficas.

En el presente estudio, fueron identificadas y aisladas cepas de *Anabaena* sp., *Leptolyngbya* sp., y mantenidas en consorcios con predominio de *Calothrix* sp.; lo que sugiere que los suelos cultivados son ricos en una diversidad de

cianobacterias e incluso, con estas capaces de contribuir con la producción de biomasa enriquecida con fuentes nitrogenadas, como producto de la fijación del nitrógeno atmosférico. Estos resultados también son similares a los reportados por Stevenson, 1986. Los dos grupos principales de procariotes son las algas verde azules y las bacterias fotosintéticas, a pesar de que ambos grupos son autótrofos y que tienen alguna habilidad heterotrófica, el primer grupo es aeróbico y el otro anaeróbico. Ambos pueden producir nitrogenasa cuando existe escasez de nitrógeno debido a que los requerimientos básicos para una adecuada fijación de nitrógeno es el ATP, tal fijación puede ser también llevada a cabo en ausencia de luz. Sin embargo, la fijación se ve limitada por la abundancia de nitratos y/o amonio (Fay, 1981). Las algas verde-azules (*Anabaena*, *Nostoc*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Calothrix*, etc.), fijan N en presencia de luz y por ende ocupan casi exclusivamente las capas superficiales de la corteza terrestre.

En relación a la producción del consorcio con las cianobacterias *Calothrix* sp., *Anabaena* sp. y *Leptolyngbya* sp., evaluadas y cultivadas en cultivos discontinuos alimentados en medio BG11₀ hasta alcanzar su escalamiento a un volumen de 10 L, se logró establecer un protocolo para la producción y mantenimiento de este consorcio. Es de indicar que, al final del proceso de producción masiva del consorcio se obtuvo una proporción de los microorganismos integrantes: *Calothrix* sp., *Geotlerinema* sp., *Anabaena* sp. y *Chlorella* sp., de 5:3:2:1, *Anabaena* sp. representada por un 90 % de acinetos.

De tal manera que la metodología aplicada en la presente investigación para la producción del consorcio cianobacteria-microalga es avalada de acuerdo a las investigaciones ya descritas. Además, que la estabilidad de tales consorcios se ha demostrado mediante cultivos discontinuos alimentados con medio BG11₀ y durante 3 meses consecutivos y en el cual se mantienen las cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

La viabilidad del consorcio inoculado en los diferentes tratamientos del suelo y en función de la presencia de *Calothrix sp.* hasta el final del ensayo, seguida de la cianobacteria *Geitlerinema sp.*, y *Anabaena sp.*, además de las microalgas *Navícula sp.*, *Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Chlamydomonas sp.*, y *Desmodesmus sp.*, quedó demostrada (Tabla 3.9), en virtud de que durante el período de 15 días, en los cuales se evaluaron las muestras obtenidas de los suelos (a los 3, 6 y 9 días) se mantuvieron presentes todas las cianobacterias y las microalgas antes mencionadas, en el tratamiento correspondiente al blanco "B" (suelo inoculado con agua) se obtuvo la presencia de *Desmodesmus sp.*, *Navícula sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Chlorella sp.*, y *Chlamydomonas sp.* En cambio, en el suelo inoculado con el sobrenadante "SC" se obtuvo el crecimiento de únicamente de *Navícula sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Chlorella sp.*, y *Chlamydomonas sp.* Así mismo, se destaca una diversidad de cianobacterias y de microalgas al final del estudio, con presencia de *Calothrix sp.*, acinetos de *Anabaena sp.*, *Geitlerinema sp.*, *Chroococcus sp.*, *Chlamydomonas sp.*, y *Navícula sp.* . De tal manera que,

estos resultados sugieren una participación significativa del consorcio con su aporte de biomasa y de nutrientes al suelo.

Al respecto, es de indicar que la biomasa microalgal es fundamental para el mantenimiento de las funciones del suelo, ya que representa el principal fuente de las enzimas que regulan los procesos de transformación de elementos en los suelos. Además de controlar la acumulación y descomposición de la materia orgánica, sirve como indicador precoz de los cambios en la gestión del suelo, de la contaminación por metales pesados y de las prácticas de fertilización (Prasanna *et. al* 2009).

El uso de cianobacterias como biofertilizantes de suelos y mediante consorcios, también ha sido descrita por (Amal *et. al* 2010), quienes a partir de cianobacterias fijadoras de nitrógeno (*Nostoc muscorum*, *Nostoc humifusum*, *Anabaena oryzae* y *Wolleea* sp) y de no fijadoras (*Phormidium* sp. y *Spirulina platensis*) cultivaron por separado cada una de estas en medio BG11 y *Spirulina platensis*, en medio Zarrouk, fueron luego combinadas en proporciones iguales en cuanto a volumen de cultivo hasta ser escalados y cosechados estos consorcios formados para ser inoculados a suelos (Amal *et. al* 2010).

Una estimación aproximada por año del aporte de nitrógeno (Arenas, 1979) considera 1000 kg N/día en todo el sistema lagunar, equivalente a 360 tons/año. Esta cifra puede ser una subestimación pues considera sólo la capa superficial del sedimento (1 cm), no obstante es improbable que en los

sedimentos más profundos se encuentre un sustrato adecuado ya que la biodegradabilidad del material orgánico es inferior al 1 %. Por otra parte, las resiembras de fijadores de nitrógeno, mostraron en medios de cultivo adecuados un potencial aproximado de 10 veces la capacidad estimada in situ, equivalente a 23.4 mg N/m²/día. Este potencial fue corroborado por las cepas aisladas de *Phormidium* y *Calothrix* cuyo rendimiento fue de 35 µgN/ g peso húmedo/día.

Según Agrobiolab (2013), como se observa en la (figura 48) el pH de 7.5, tanto en el suelo no inoculado como en el inoculado con el sobrenadante del cultivo, corresponde a un rango entre neutro y ligeramente alcalino. Así como el inoculado con el consorcio a un volumen de 75mL, con un pH de 7.3. En cambio, se observó una tendencia al incremento del pH, con el volumen del consorcio inoculado en el suelo, entre 7.9 y 8.0. Esto coincide con un suelo del tipo moderadamente alcalino. Por otra parte, hay que tomar en cuenta que el pH del cultivo del consorcio estuvo entre 7.3 y 8. Además, de considerar la presencia del Na₂CO₃ en el medio de cultivo BG11₀ utilizado para el crecimiento del consorcio, el cual estuvo ausente de fuentes nitrogenadas (Manual, 1993).

Entre otros factores que también pueden contribuir al incremento del pH en suelos se encuentra la presencia de cationes básicos (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Na⁺); lo cual estaría relacionado con una acumulación de sales solubles que se clasifican como suelo salino, suelos salino-sódicos o suelo alcalino. Todos los

suelos salinos y sódicos tienen altas concentraciones de sal. Así, los suelos salinos están dominados por las sales de calcio y magnesio y los suelos sódicos están dominados por el sodio (F. Prieto-García, 2007).

En este sentido, el contenido de K, Ca y Mg en los suelos inoculados S-150 y S-300 estuvo entre 0.66-0.61; 15.12-14.88 y entre 4.25-4.13; lo que posiblemente pudo haber contribuido también al aumento del pH en estos dos suelos inoculados.

De acuerdo a los valores obtenidos de la materia orgánica (%) (figura 50), en todas las muestras de suelos, desde 2.78% en la muestra S-75 hasta 3.24% en S-300, estima un alto contenido; ya que valores superiores a 2.0%, ya se catalogan como con un suficiente contenido de materia orgánica (Agrocalidad, 2013) o como suelos orgánicos de acuerdo a la clasificación de Walkley Black (Carreira, 2005). El incremento a 3.19% de M. O, obtenido en SC, posiblemente sea debido a la adición del sobrenadante del cultivo del consorcio, el cual está enriquecido con nutrientes a excepción del nitrógeno, y a la vez esta condición lograría activar la microflora microbiana existente en dicho suelo y por lo tanto, un ligero aumento de esta materia orgánica estuvo relacionado con el crecimiento de estos microorganismos, los cuales representan parte de esa materia orgánica (Báscones, 2005). No obstante, la inoculación del consorcio a volúmenes de 75, 150 y 300 mL ha debido de haber incrementado proporcionalmente el porcentaje de materia orgánica; y adicionalmente al contenido basal obtenido en la muestra SC-A (suelo

solamente mantenido con agua potable). Es por ello que se observa el mayor contenido de M. O, en S-300 con 3.24%; lo que demuestra un resultado real como era de esperar, a medida que se aumentaba el volumen del consorcio inoculado en dicho suelo.

Los microorganismos participan de forma importante en el ciclo del nitrógeno en el suelo, debido a que realizan la fijación del nitrógeno, nitrificación y desnitrificación, así como su inmovilización. Y para el análisis del contenido de nitrógeno se reportan como fracciones predominantes al amonio y nitratos (Foster, 1995).

En este sentido se consideró el contenido de NH_4^+ y de NO_3^- en dichas muestras de suelos como otros de los parámetros esenciales para establecer el perfil de fertilidad de suelos inoculados con cianobacterias. Según los valores obtenidos de amonio (figura 52) entre 36.80 y 42.80 ppm, y de nitrato (figura 54) entre 94.50 y 173.30 ppm este suelo contiene un elevado contenido de ambas fuentes nitrogenadas (NOM-021-RECNAT, 2002); aunque de acuerdo a la normativa ecuatoriana de Agrocalidad se establece que estos valores están catalogados entre medios y aceptables.

El suelo control solo con agua contiene el mayor valor de nitrato, con 173.30 ppm, lo cual sugiere que es muy nutritivo para cultivo de plantas. Sin embargo, se observa un descenso de su contenido cuando el mismo es inoculado con el sobrenadante y dicho decrecimiento se hace más evidente con el incremento del volumen del consorcio. Estos resultados, posiblemente

estén relacionados con la estimulación del crecimiento de la biota presente en el suelo y la inoculada, la cual al ser activada su capacidad metabólica, utilizó las reservas de nitrato existentes en el suelo control. Por lo tanto, esta reducción del contenido del nitrato también en el suelo con el consorcio, obedecería de igual modo por procesos de desnitrificación realizado por bacterias existentes en el suelo y quizás estimulada por el consorcio de cianobacterias desde S-75 hasta S-300.

Entre los principales factores que contribuyen a la pérdida de nitratos en suelos se incluyen altos contenidos del mismo, por inducción o estimulación de la biota desnitrificante, suelos con mayor fertilidad por su contenido de materia orgánica o fertilizados, y la otra condición predisponente corresponden a pH de neutros o ligeramente alcalinos por su efecto sobre la actividad biológica bacteriana del suelo (Hauck, 1981).

En relación al amonio se presentaron valores similares en el suelo control (SC-A), en el suelo con el sobrenadante (SC), y en el suelo inoculado con 75 mL del consorcio (S-75). De tal manera que estos valores, son suficientes para considerar suelos con fertilidad moderada. Se destaca que en el suelo inoculado con el mayor volumen del consorcio (S-300) hubo un ligero incremento del amonio hasta 41.8 ppm, lo cual puede atribuirse a la capacidad fijadora de nitrógeno de la cianobacteria *Calothrix* sp, la cual es la predominante en dicho consorcio inoculado; de tal manera que el suelo es enriquecido con esta fuente nitrogenada solo por la fijación del nitrógeno

atmosférico. Este resultado infiere la importancia del uso de consorcios con cianobacterias fijadoras de nitrógeno a fin de elevar los niveles de nitrógeno amoniacal en dichos suelos, contribuyendo a elevar la fertilidad de los mismos (Barbazán, 2010).

Debido a que los microorganismos liberan nitrógeno bajo forma de amonio (NH_4^+) en el suelo, otros microorganismos rápidamente convierten el amonio en nitrato (NO_3) el cual está contenido de materia orgánica de un suelo bajo diferentes regímenes de labranza fácilmente disponible para ser absorbido (Balota, 1996).

Para el fósforo (figura 56), el análisis de su contenido en suelos también representa un parámetro para considerar la fertilidad o la calidad de nutrientes presentes. En términos generales, el fósforo del suelo se clasifica en fósforo orgánico e inorgánico, dependiendo de la naturaleza de los compuestos que forme. La forma orgánica se encuentra en el humus y la materia orgánica, y sus niveles en el suelo pueden variar desde 0 hasta mayores que 0.2%. Los análisis de P sirven también para el control de la dosificación de productos químicos en tratamientos de agua o suelos, o como un medio para determinar que un sistema presenta contaminación (Muñoz, 2000).

El suelo utilizado para la presente investigación también se considera con un alto contenido de fosfato, el cual presentó niveles de 93.50 ppm (SC-A). Luego, en la muestra de suelo inoculada con el sobrenadante incrementó a 111.0 ppm, como indicativo de que aun el fosfato en el medio BG11₀ utilizado

para el cultivo del consorcio, no ha sido asimilado totalmente. Lo que sorprende es que con el incremento del volumen del consorcio, desde 75 ml hasta 300 mL, baja el contenido de fosfato de 109.0 ppm hasta 102.0 ppm en S-75 hasta S-300, respectivamente. Es posible, que el aporte del K_2HPO_4 contenido en el medio BG11₀ (0.2 mM), no es utilizado eficientemente y por eso se mantiene aún en el sobrenadante. Esto significa que se recomienda, un experimento para evaluar la cinética de consumo del fosfato en un cultivo discontinuo del consorcio con *Calothrix* en relación al tiempo de incubación de dicho consorcio. De cualquier forma, se evidencia que el suelo más enriquecido con fosfato cuando fue inoculado con el sobrenadante (medio BG11₀ remanente) y con los diferentes volúmenes del consorcio (Muñoz, 2000).

Con respecto al sulfato (figura 78) también se demuestra la misma tendencia observada para el caso del fosfato. Es decir, hubo un incremento desde 31.70 ppm de sulfato en el suelo control hasta 34.7 ppm con la adición al suelo del sobrenadante del cultivo (SC), y con la correspondiente y ligera disminución del contenido de sulfato conforme aumenta el volumen del consorcio inoculado en S-300. Además, de observarse igualmente un aumento del contenido de sulfato en todos los tratamientos con el sobrenadante y consorcio, respecto al control SC-A.

Es de tomar en cuenta que el sulfato también es esencial para el crecimiento del consorcio y para aumentar la fertilidad del suelo. Su adsorción

está influenciada por el contenido de materia orgánica, pH, composición mineralógica de los suelos y el orden de adición de sulfato y fosfato en los suelos. Tanto el sulfato como el fosfato pueden competir, si el sulfato particularmente es adicionado antes que fosfato y a bajos valores de pH (pH 4,4) (Pigna, 2007). En nuestro caso, el pH del suelo estuvo en el rango alcalino.

Para el caso del incremento del fosfato y sulfato con solo la adición del sobrenadante del cultivo del consorcio, este está funcionando como un fertilizante y por tanto enriqueciendo el suelo con estos dos nutrientes.

El contenido de K, Mg y Ca (figura 58, 52 y 60) en relación a los valores mínimos obtenidos en SC-A de 0.48, 3.89 y de 13.07 meq/100 mL son considerados altos (Fernández, 2006). Así mismo, estos resultados coinciden con el criterio establecido por Agrocalidad, 2013. Se aprecia en las figuras para el K, Mg y Ca, un ligero aumento de estos cationes en los suelos inoculados; lo que indica un enriquecimiento moderado de estos en dichos tratamientos, debido a los aportes del potasio ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O/0.2$ mM); del Calcio ($Cl_2Ca/0.24$ mM) y del Mg ($SO_4Mg/0.3$ mM), presentes en el medio BG11₀.

En relación al contenido de Fe (figura 70) se demostró que el suelo utilizado para el presente estudio presenta un alto valor de 48.4 ppm; el cual supera el valor mínimo para ser considerado alto, de 41 ppm (Agrocalidad, 2013). La tendencia del contenido de Fe en los suelos inoculados con la

biomasa del consorcio de la cianobacteria fue la de incrementar la proporción del catión, siendo la más elevada en el tratamiento S-75 con 58.70 ppm.

En cuanto al Mn (figura 57) el suelo evaluado refleja un bajo contenido el cual está entre 0-5 ppm (Agrocalidad, 2013). No obstante, al incrementar el volumen del consorcio con la cianobacterias se observó una tendencia a incrementar hasta 5.20 ppm, valor en el extremo superior del bajo contenido de Mn en suelo. Esto es debido a la acumulación del catión con el incremento de la biomasa en el tratamiento S-300, siendo el compuesto utilizado en el medio BG11, el $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,81 \times 10^{-3}$ g/L). Es decir hubo adición de manganeso por el sobrenadante y el consorcio más sobrenadante; el cual refleja presencia de manganeso como remanente de los oligoelementos del medio de cultivo no consumidos.

Respecto al Na (figura 64) se demostró que el suelo utilizado para el presente estudio presenta un valor bajo 0.6 (meq/100 mL); (Agrocalidad, 2013). La tendencia del contenido de Na en los suelos inoculados con la biomasa del consorcio de la cianobacteria fue la de incrementar la proporción en S-75 y disminuir en S-150, S-300, siendo la más elevada en el tratamiento S-75 con 0.85 (meq/100 mL);

El suelo control no inoculado y los inoculados con el sobrenadante del cultivo y con el consorcio mantuvieron niveles similares de cobre, entre 5.50 ppm en SC-A y 5.90 ppm en SC-300. De acuerdo, a estos valores el contenido

de cobre en estos tratamientos es alto; cuyo valor mínimo corresponde $Cu > 4.1$ ppm (Agrocalidad, 2013).

Haciendo referencia al Zn y al B (figura 74 y 76), estos permanecieron con valores superiores, de acuerdo al registro de rangos bajo, medio y alto; siendo el de Zn > 6.1 ppm y el de B > 2 ppm. No obstante, los resultados indican que con la inoculación del consorcio no hubo variabilidad aparente en los valores de ambos elementos. Para el caso del Zn, niveles de zinc por debajo de 4 ppm generarían una recomendación para su aplicación en suelos antes de la siembra (Espinoza L, 2008).

Se espera que con forme aumenta la biomasa debe existir más retención de sodio, a 150 y 300 mL no se observa ningún incremento significativo. Según AGROBIOLAB, 2013. El sodio se mantiene en un valor suficiente.

En todos los tratamientos se observa un ligero incremento de aluminio con respecto al nivel basal, al no tener aporte de aluminio en el medio de cultivo se debe analizar el aporte de estos elementos en el agua de laboratorio. Sin embargo, estos niveles de aluminio no representan toxicidad en suelos y de acuerdo a AGROBIOLAB, 2013, se mantiene en un valor medio.

La capacidad de intercambio catiónico (CICE) se refiere a la habilidad de las partículas de suelo que tienen carga negativa para atraer y retener cargas positivas de iones [calcio (Ca^{++}), magnesio (Mg^{++}), potasio (K^+), sodio (Na^+), amonio (NH_4^+), aluminio (Al^{+++}) y hidrogeno (H^+)]. La capacidad de intercambio catiónico es expresadas en unidades de centimoles por

kilogramo (cmol/kg) o en (meq/100mL). Además, es un del potencial del suelo para retener e intercambiar nutrientes vegetales, mediante la estimación de su capacidad para retener cationes. En base a los valores más altos reportados, se considera una alta reserva nutrimental cuando la CICE es mayor que $25 \text{ cmol (+) kg}^{-1}$ de suelo (Espinoza L, 2008).

De acuerdo a la clasificación de la fertilidad de suelos según la CICE (Fernández, 2006), el suelo evaluado con un valor 18.46 meq/100mL , pertenece a la clase de suelo medio (15-25). Se observa que la CICE no presentó variabilidad significativa, por lo que la tendencia de un leve incremento, pueda deberse a los cationes acumulados con la inoculación del sobrenadante y del consorcio.

Los resultados de la físicoquímica del suelo control y el inoculado con el consorcio y con el sobrenadante remanente del cultivo de dicho consorcio, sugiere que ocurre un enriquecimiento del amonio, sulfato, fosfato, hierro, manganeso y del a capacidad de intercambio catiónico, aún cuando la materia orgánica pareció no haber variado.

Por lo tanto, se sugiere que la inoculación del consorcio en suelo, parece ser eficiente como acondicionador del suelo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. El consorcio de cianobacterias *Calothrix sp.*, *Leptolyngbya sp.* y *Anabaena sp* fue aislado con el uso de medio de cultivo BG11₀ en base a la técnica de siembra por estriado en medio sólido.
2. Se logró el aislamiento de la cianobacteria *Calothrix sp.*, utilizando la técnica de estriado en medio BG11₀ sólido y líquido.
3. *Calothrix sp* resultó ser la cianobacteria con mayor adaptabilidad para mantenerse viables en el medio de cultivo y en el suelo, puesto que estuvieron presentes sobre el sustrato a lo largo de todo el ensayo. Además demostraron una amplia relación biológica entre varias microalgas y cianobacterias tanto fijadoras como no fijadoras de nitrógeno.
4. Con el aumento de 3 ml de extracto de suelo se induce el crecimiento de *Anabaena* sobre *Calothrix*, es decir *Anabaena* ejerce un efecto competitivo con extracto de suelo.
5. Con el aumento de 6 ml de suelo disminuye drásticamente la población de *Calothrix* y *Anabaena* por tanto no se recomienda aplicarlo a esta dosis.
6. La sucesión de especies tanto de microalgas como de cianobacterias en el suelo evidenciaron su posible relación con la disponibilidad de nutrientes, temperatura, flora bacteriana asociada, iluminación y pH.

7. El mejor tratamiento para producción de biomasa fue el medio BG11₀ con extracto de suelo por el aporte de silicato que este realiza en el medio.
8. Se estableció un protocolo para la producción y mantenimiento de consorcios con cianobacterias fijadoras de nitrógeno de acuerdo al tipo de suelo, medio de cultivo y condiciones de escalado de los cultivos discontinuos. La conformación de consorcios cianobacterias-microalgas en biotecnología agrícola permite ampliar el espectro de microorganismos utilizados en acondicionamiento de suelos.
9. Los resultados de la físicoquímica del suelo control y el inoculado con el consorcio y con el sobrenadante remanente del cultivo de dicho consorcio, sugiere que a 75 mL de consorcio ocurre un enriquecimiento de macro y micro nutrientes.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

1. Evaluar características químicas del EPS en función de la viscosidad, capacidad de bioabsorción de metales pesados, actividad surfactante con crudos de petróleo y actividad de biofloculante en la clarificación de líquidos en función de su utilización biotecnológica.
2. Trabajar con mayor volumen de información cuando se requiera comparar tratamientos para producción de biomasa.
3. Optimizar la producción de biomasa en cultivos semicontinuos en función de diversos parámetros ambientales.
4. Diseñar estrategias tecnológicas para inocular los consorcios de cianobacterias en suelos con cultivos extensivos y en suelos erosionados.

BIBLIOGRAFIA

- Abed, J. A. (2009). Microalgas: Cultivo y aplicaciones. *Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Coruña.*
- Albarracín, I. (2007). Microalgas potenciales productoras de biodiesel. La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. *XV Simposio electronico internacional.*, 32.
- Aldave-Pajares, A. (1969). Cushuro, algas azul-verdes como alimento en la region alta andina peruana . 244.
- BA, W. (1987). The biology of the Rivulariaceae. *The Cyanobacteria: A Comprehensive Review*, Vol. 1 (Fay P & Baalen CV, eds). 513–534.
- Balota, E. D. (1996). Avaliações microbiológicas em sistemas de preparo solo e sucessão de culturas. In: *I Congresso Brasileiro de Plantio Direto para uma Agricultura Sustentável*. Ponta Grossa,. 523.
- Barbazán, P. C. (2010). Nitrógeno. Área de suelos y aguas. Cátedra de fertilidad.
- Báscones, E. (2005). *Análisis de Suelos y Consejos de Abonado*. Valladolid: INEA.
- Beingerink, M. (1890). Kulturversuche mit Zoochlorenllen, Lichenengoniden and anderen niederen Algen. 725.

- Blanco, C. (1999). Commercial aspects of utilizing microalgae with special reference to animal feeds. Bloemfontein. *Univ. Orange Free State*.
- Briones, H. K. (1997). A comparison of physical properties, oxalate-oxalic acid soluble substances, protein content, and in vitro protein digestibility of the green alga *Nostoc commune* Vauch. 480.
- Brock, T. (1973). Lower pH Limits for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. . *Science*, 480-483.
- Carreira, D. (2005). Carbono oxidable: una forma de medir la materia orgánica del suelo. *Tecnología de análisis de suelo.*, 1-6.
- Casamatta, R. H. (2005). Evaluación del establecimiento de tres variedades de pasto Raygrass (*Lolium* sp.) en potreros de pasto kikuyo (*pennisetum clandestinum*).
- Cavalié, S. (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 7-76. Obtenido de 26. Cavalier-Smith, . (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, , 52: 7-76.
- Chico, M. (2010). *Caracterización a nivel de laboratorio de tres cianobacterias aisladas del área foliar de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta mediante clave microscópica, tiempo de generación y producción de*

proteína según fuente de nitrógeno. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/572>.

Cohen, Z. (1999). Indoor Air Pollution Chapter 2. En Human Exposure to Pollutants via Dermal Absorption and Inhalation - Environmental Pollution . *Springer Science.*, 41-72.

Coria, C. (1999). Evaluación del potencial biotecnológico de *Calothrix* sp. Tesis de Licenciatura E.N.C.B. del I.P.N.

De, P. E. (2000). Assessment of the potential of *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *J: Appl. Phycol.*, . 12,401-407.

Díaz, M. P. (1959). Taxonomía, ecología y valor nutrimental de algas marinas cubanas: Algas productoras de agar. Cuba. ICIT/SESTI. (6):. 69p. 1959.

Dola Bhowmik, J. D. (2010). La evaluación del potencial de la *Spirulina* como inoculante para Pulsos. *Academic Journal of Plant Ciencias*, 20103 (4): . 161-164.

Domínguez, A. (1999). Obtención de pigmentos a partir de microalgas. Universidad de Santiago de Compostela . España.

Escalona, A. (2004). " Efecto de la concentración de nitrato en la composición química de la cianobacteria *Calothrix* sp." .

- Espinoza L, S. N. (2008). Como Interpretar los Resultados de los Análisis de Suelos. . *DIVISION OF AGRICULTURE. RESEARCH & EXTENSION. University of Arkansas System.*
- F. Prieto-García, C. A. (2007). Caracterización fisicoquímica y extracción secuencial de metales y elementos trazas en suelos de la región Actopan-Ixmiquilpan del distrito de riego 03. *Ciencia Ergo Sum*, 69-80.
- Falch B., K. G. (1995). Biological activities of cyanobacteria: Evaluation of extracts and pure. . *Planta Med.*
- Fernández, C. e. (2006). Manual de técnicas de análisis de uelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. *Instituto Mexicano del pretroleo Secretaria de Medio Ambiente y Recursos renovables*, 179.
- Fleming, H. &. (1973). Differentiation in Nostoc muscorum: Nitrogenase Is Synthesized in Heterocysts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*
- Foster, J. (1995). Methods in applied soil microbiology and biochemistry. *Soil nitrogen. En Alef, K. and Nannipieri, P.*
- García M., e. a. (1989). Effect of Irradiance on Productivity and Pigment Composition of Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. Photoconversion Processes for Energy and Chemicals. *London, Gran Bretaña. Elsevier Applied Science Publ. , 248-257.*

- Gatenby, C. (2003). Biochemical composition of the three algal species proposed as food captive freshwater mussels. *J. Appl. Phycol.* 15(1). 1-11.
- Geitler, L. (1985). *Cyanophyceae*. Koenigstein, Germany: KoeltzScientific Books, . 1196.
- Guerrero y Lara. (1987). The relationship between intracellular pH, growth characteristics and calcium in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 exposed to low pH. *New Phytologist* 137:.. 599-605.
- Hauck, R. (1981). Nitrogen fertilizer effects in nitrogen cycle processes. *Swedish Natural Science Research Council, Stockholm*, 551-562.
- Healey, D. K. (1982). Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during dessication. *J. Appl. Phycol.* 9. 237-48.
- Hernández y Olgúin, 2., Olgúin, 2., & Guieysse, M. y. (2006). Symplostantin 2: a dolastatin 13 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydroides*. *J. Nat. Prod.*
- Hoffmann, M. T. (1998). Comportamiento de *Anabaena cilíndrica* en diferentes medios de cultivo. *Revista CENIC Cien Biol.* 89-92.
- Joan, R. (2000). *Fitoplancton de agua dulce: aspectos ecológicos, taxonómicos y sanitarios*. Universidad de Antioquia.

- Kowalski, W. (2009). Chapter 14 Microbiological Testing. En W. Kowalski, Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook - UVGI for Air Surface Desinfection. *Springer Verlag Berlin Heidelberg.*, 337-360.
- Kurmayer, R. (2011). The toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions . *J. Phycol.* . .
- Lebeau, T., & Robert, J. M. (2003). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. *Cultivation at various scales. Appl Microbiol Biotechnol* 60 , 612–623.
- Lee, R. E. (1999). *Phycology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 645.
- Liu X, J. Y. (2004). Fatty acid profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. *Process Biochemistry* .
- Lugo, M. (2 de septiembre de 2012). *Diversidad vegetal I U.N.S.L. Guía de trabajos prácticos*. Obtenido de [/www0.unsl.edu.ar/~fqbf/departamentos/BioqBiol_/apuntes_archivos/ecologia/diversidad_vegetal/parte_1.pdf](http://www0.unsl.edu.ar/~fqbf/departamentos/BioqBiol_/apuntes_archivos/ecologia/diversidad_vegetal/parte_1.pdf).
- Mandal B, V. P. (1998). Beneficial effect of blue-green algae and *Azolla* excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: a review. . *Biology & Fertility of Soils* , 329-342.

- Mandal, B. (1998). Beneficial effect of blue-green algae and Azolla excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: a review. *Biology & Fertility of Soils* 27. 329-342.
- Manual, S. s. (1993). Soil survey division staff. *Soil Conservation Service. U.S.*, Chapter 3.
- Margalef, R. 1. (1997). Our Biosphere. En: Excellence in Ecology. O. Kinne (Ed).Oldendorf, Ecology Institute. 211; 219; 275-277.
- Margalef, R. (1997). Our Biosphere. En: Excellence in Ecology. O. Kinne (Ed).Oldendorf, Ecology Institute. 211; 219; 275-277.
- Marsac, T. D. (1997). Effects of hot-water extracted from Nostoc flagelliforme on the macrophage activities. . *Med. Biol.*, .
- Melis, T. (2005). Integrated Biological Hydrogen Production Proceedings International Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC .
- Mendez, J. (2007). Biotecnología microalgal y obtención de productos químicos y alimenticios. *Biotecnología microalgal*.
- Muñoz, I. M. (2000). Manual de análisis de suelo. Edafología. *Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, México*.
- Mur, L. R. (1999). Cyanobacteria in the environment. En Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus and J. Bartram (eds.). 15-40.

- NOM-021-RECNAT. (2002). Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México. *Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000)*. .
- Paasche, E. (1960). On the relationship between primary production and standing stock of phytoplankton. . 33-48.
- Patil, C. (2012). Screening of indigenously isolated Nostoc sp. for chromium tolerance. *J. Algal Biomass Utiln.* 3 (3). 30– 33.
- Pigna, M. ., (2007). Effect of pH, phosphate and/or malate on sulfate sorption on andisols. *J. Soil Sc Nutr.* 62-73.
- Prosperi, C., & Fernandez – Valiente, E. (1993). Influence of Ph, Light intensity and oxygen on the short-term effect of ammonium on nitrogenase activity of cyanobacteria from rice fields. *Environmental and Experimental Botany.* 545-552. .
- Puotinen, C. (2009). Detoxification Herbs Natural Body Cleansing Treatments. Suite 101.com, insightful writers.informed readers.
- R, B. R. (1998). Tenuocyclamides A-D, cyclic hexapeptides from the. *Tenue. J. Nat. Prod.*
- Ramírez, J. (2000). Fitoplancton de agua dulce: aspectos ecológicos, taxonómicos y sanitarios. Universidad de Antioquia.

- Rasmussen, U. &. (1998). Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 265-272.
- Rodans, N. (2005). *Evaluación de la actividad biológica de extractos de la cianobacteria Nostoc Laun 0015, en condiciones de laboratorio.*
- Rodans, N. (2005). Evaluación de la actividad biológica de extractos de la cianobacteria Nostoc Laun 0015, en condiciones de laboratorio. Maracaibo, Venezuela.
- Sanchez, B. (2009). Bacteria, algae, and phycobionts: maintaining useful concepts and terminology. *The Lichenologist United Kingdom*, 269-275:269-275.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* . 101,7-12.
- Shapiro, J. (1973). Blue-green algae: why they become dominant. *Science*. 382-84.
- Sheridan, R. P. (2001). Role of ultraviolet radiation in maintaining the three dimensional structure of a cyanobacterial mat community and facilitating nitrogen fixation. . 731 - 737.
- SilvaP, G. D. (1998). Nutritional evaluation of Cyanobacterium (Nostoc sp.) extract in Rhizobium cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* , 135.

- Sitte, P. E. (2004). Strasburger. Tratado de Botánica. 35ª edición, Editorial Omega. Barcelona.
- Solutions, S. A. (2012). *Acondicionadores de suelo*. Obtenido de <http://www.coda-agri.com/es/productos/correctores-de-suelos-y-acondicionadores-de-suelo-agu>
- Stewart, I. P. (2006). Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environmental Health: A Global Access Science Source* , 543.
- Stewart, I. P.-a. (2006). Review, Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 5:7:doi:10.1186/1476-069X-5-7.
- Strickland, J. y. (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Ottawa , Canadá: Fish. Res. Board Can. Bull.*, 345.
- Strickland, J. y. (1972). A practical handbook of seawater analysis. . Ottawa , Canadá: Fish. Res. Board Can. Bull.
- Svenning, R. U. (1998). Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 64:. 126.
- Rasmussen U. & Svenning M. M. (1998). Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from 265-272.

- Walsby, B. &. (1974). In *The Biology of Cyanobacteria*. N.G. Carr & B.A.Whitton eds. *Botanica Monographs. Vol.19. University of California Press. US.*, 515 – 542p.
- Walsby, B. &. (1974). Marine Littoral. In *The Biology of Cyanobacteria*. N.G. Carr & B.A.Whitton eds. *Botanica Monographs. Vol.19. University of California Press. US.*, 515 – 542.
- Walsby, B. (1974). In *The Biology of Cyanobacteria*. N.G. Carr & B.A.Whitton eds. *Marine Littoral.Botanica Monographs. Vol.19. University of California Press. US.*, 515 – 542.
- Weckesser, D. y. (1982). Assessment of the potential of Nostoc strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *J: Appl. Phycol.*,. 12,401-407.
- Woese, B. (1987). The biology of the Rivulariaceae. *The Cyanobacteria: A Comprehensive Review. Vol. 1* 513–534.

ANEXO A

ANEXO 1: Composición y análisis físico químico (medios de cultivo).

ANEXO 2: Análisis Físico químico del extracto de suelo antes de la inoculación del consorcio de cianobacterias.

AGROBIOLAB											
Informe de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y E.C.P.											
LABORATORIO DE ENSAYO, BAJO LA NORMA INTERNACIONAL ISO 17025											
Gonzalo Zaldumbide N49-204 y Luis Calafate Urb. Danneer 2 (El Inca) Telf: (593-2) 241-2383 241-2385 Fax: (593-2) 241-3312 Quito - Ecuador											
Página Web: www.clinica-agricola.com E-mail: agrobiolab@clinica-agricola.com											
SUELOS											
Datos del Cliente				Referencia		Interpretación					
Cliente : MORALES EVER Prop / Dir : MORALES EVER Cultivo : PERFILES Ingreso : 18/03/2014 No. Lab. : Desde :145035				No. Doc.: 47470 Emisión: 27/03/2014 Impreso: 28/03/2014 Página: 1 de 4		Textura Bss. S.R. 1982 Arc = Arcilloso As = Arenoso Li = Limoso Ar = Arena Fca = Franco		Elementos PEEF, 07/16, 1979 B = Bajo M = Medio S = Suficiente A = Alto E = Exceso		pH Rios, J.E. 1962 Ac = Acido LA = Ligt. Acido Pn = Presc. Neutro LAJ = Ligt. Alcalino Al = Alcalino	
Nombre: TIERRA No. Lab.: 145035 Profund (cm): 0-20											
*pH	*C. E. mmhos/cm	*M. O. %	*NH4 ppm	*NO3 ppm	P ppm	K meq/100ml	Ca meq/100ml	Mg meq/100ml	*Na meq/100ml	*AL+H meq/100ml	CICE meq/100ml
7.50 ± 1.10	2.57A ± 12.53	3.08B ± 4.45	38.10M ± 4.11B	173.30B ± 4.11B	93.50A ± 14.98	0.48A ± 0.08	13.07B ± 2.55	3.89A ± 0.88	0.50B	0.42M	18.45B
CU ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm	*B ppm	*SO4 ppm	Fe/Hn R1	Ca/Mg R2	Mg/K R3	Ca/Mg/K R4		
5.50A ± 1.10	48.40A ± 12.53	2.90B ± 4.45	11.80B ± 4.45	31.70B	16.89A	3.38A	8.10E	35.33B			
Nombre: MUESTRA B No. Lab.: 145036 Profund (cm): 0-20											
*pH	*C. E. mmhos/cm	*M. O. %	*NH4 ppm	*NO3 ppm	P ppm	K meq/100ml	Ca meq/100ml	Mg meq/100ml	*Na meq/100ml	*AL+H meq/100ml	CICE meq/100ml
7.80 ± 1.12	2.93A ± 12.85	2.98M ± 4.20B	43.00M ± 4.40B	162.10B ± 4.40B	90.00A ± 14.40	0.57A ± 0.10	15.01B ± 2.70	4.38A ± 0.74	0.75B	0.44M	21.13A
CU ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm	*B ppm	*SO4 ppm	Fe/Hn R1	Ca/Mg R2	Mg/K R3	Ca/Mg/K R4		
5.50A ± 1.12	48.70A ± 12.85	4.20B ± 4.45	13.50E ± 4.45	38.40B	11.59A	3.44A	7.64E	33.98B			
Nombre: MUESTRA C-75 No. Lab.: 145037 Profund (cm): 0-20											
*pH	*C. E. mmhos/cm	*M. O. %	*NH4 ppm	*NO3 ppm	P ppm	K meq/100ml	Ca meq/100ml	Mg meq/100ml	*Na meq/100ml	*AL+H meq/100ml	CICE meq/100ml
7.35 ± 1.10	3.20B ± 15.28	2.78M ± 4.20B	39.30M ± 4.45	150.40A ± 4.56B	109.00B ± 17.61	0.54A ± 0.09	13.82B ± 2.25	4.21A ± 0.71	0.85B	0.48M	19.70B
CU ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm	*B ppm	*SO4 ppm	Fe/Hn R1	Ca/Mg R2	Mg/K R3	Ca/Mg/K R4		
5.50A ± 1.10	58.70A ± 15.28	4.20B ± 4.45	12.20E ± 4.45	44.10A	13.97A	3.23A	7.79E	33.01B			
Nombre: MUESTRA C-150 No. Lab.: 145038 Profund (cm): 0-20											
*pH	*C. E. mmhos/cm	*M. O. %	*NH4 ppm	*NO3 ppm	P ppm	K meq/100ml	Ca meq/100ml	Mg meq/100ml	*Na meq/100ml	*AL+H meq/100ml	CICE meq/100ml
7.90 ± 1.12	2.52A ± 12.71	2.93M ± 4.50B	36.80M ± 4.45	115.40B ± 3.55A	107.00B ± 17.12	0.68A ± 0.11	15.12B ± 2.72	4.25A ± 0.72	0.85B	0.55M	21.23A
CU ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm	*B ppm	*SO4 ppm	Fe/Hn R1	Ca/Mg R2	Mg/K R3	Ca/Mg/K R4		
5.50A ± 1.12	48.90A ± 12.71	4.50B ± 4.45	11.50E ± 4.45	41.00A	10.86A	3.55A	8.43E	29.34B			
Nombre: MUESTRA C-300 No. Lab.: 145039 Profund (cm): 0-20											
*pH	*C. E. mmhos/cm	*M. O. %	*NH4 ppm	*NO3 ppm	P ppm	K meq/100ml	Ca meq/100ml	Mg meq/100ml	*Na meq/100ml	*AL+H meq/100ml	CICE meq/100ml
8.00 ± 1.18	2.18A ± 13.15	3.24B ± 1.40	41.80M ± 4.45	94.50B ± 16.32	102.00B ± 16.32	0.61A ± 0.10	14.88B ± 2.87	4.13A ± 0.70	0.80B	0.48M	20.89A
CU ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm	*B ppm	*SO4 ppm	Fe/Hn R1	Ca/Mg R2	Mg/K R3	Ca/Mg/K R4		
5.90A ± 1.18	50.80A ± 13.15	5.20B ± 1.40	11.90E ± 4.45	3.12A	38.70B	9.73A	3.60A	6.77E	31.18B		

Simbolo decimal = (.)
 Los valores con incertidumbre (+/-) están calculados con un nivel de confianza del 95% (t+2)
 *L.C. = Valor menor al Límite de Cuantificación
 Métodos: pH 1.2.5 H2O; C.E., Na: Peste saturada; M.O.: Walkley and Black; Al+H: Olsen Modificado B; Fosfato Monocálcico; NH4,NO3, SO4:Colorimetría.
 Métodos Valordados: Ca: PEEIASL01; Mg: PEEIASL02; P: PEEIASL03; K: PEEIASL04; Zn, Cu, Fe, Mn: PEEIASL05
 Note: Los ensayos marcados con (*) no tienen sus valores de incertidumbre.
 **Fecha Inicial de Ensayo; La Fecha Final de Ensayo es cuatro días laborables a partir de la Fecha Inicial de Ensayo.
 Resultados corresponden a muestras analizadas, si se va a fotocopiar hacer del documento total.


 Dr. Washington A. Padilla G. Ph.D
 Director del Laboratorio
¡SU ÉXITO ES NUESTRO!

Figura A. 1: Análisis Físico químico del extracto de suelo antes de la inoculación del consorcio de cianobacterias.

ANEXO 3: Análisis Físico químico del extracto de suelo luego de inocular el consorcio de cianobacterias.

AGROBIOLAB											
Informe de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y E.C.P.											
LABORATORIO DE ENSAYO, BAJO LA NORMA INTERNACIONAL ISO 17025											
Gonzalo Zaldumbide N49-204 y Luis Calisto Urb. Dammer 2 (El Inca) Telfa: (593-2) 241-2383 241-2385 Fax: (593-2) 241-3312 Quito - Ecuador											
Página Web: www.clinica-agricola.com E-mail: agrobiolab@clinica-agricola.com											
SUELOS											
Datos del Cliente				Referencia		Interpretación					
Cliente : MORALES EVER Prop / Dir : MORALES EVER Cultivo : PERFILES Ingreso : 18/03/2014 No. Lab. : Desde : 145040				No. Doc.: 47470 Emisión: 27/03/2014 Impreso: 28/03/2014 Página: 2 de 4		Textura <small>Soil. S.M. 1982</small> Fco = Franco Arc = Arcilloso Ar = Arenoso Li = Limoso Ar = Arena Fco = Franco		Elementos <small>SNF, 1974</small> S = Bajo M = Medio S = Suficiente A = Alto E = Exceso		pH <small>Kat, J.E. 1962</small> Ac = Acido LA = Lig. Acido Pn = Prac. Neutro LAI = Lig. Alcalino Al = Alcalino	
Nombre : MUESTRA SC No. Lab. : 145040 Profund (cm): 0-20											
*pH	*C. E. mmhos/cm	*M. O. %	*NH4 ppm	*NO3 ppm	N ppm	K meq/100ml	Ca meq/100ml	Mg meq/100ml	*Na meq/100ml	*AL+E meq/100ml	CICE meq/100ml
7.50A	2.93A	5.19B	39.30B	151.80A	111.00B ± 19.75	0.63A ± 0.11	14.70B ± 2.84	4.06A ± 0.69	0.75B	0.50B	20.64A
Cd ppm	Pb ppm	Hg ppm	Zn ppm	*B ppm	*SO4 ppm	Pw/Std R1	Ca/mg R2	Mg/K R3	Ca+Mg/K R4		
5.20A ± 1.04	48.30A	4.30B	11.40B ± 4.97	3.67A	34.70B	10.76A	3.62A	6.44B	29.77B		

Figura A. 2: Análisis Físico químico del extracto de suelo luego de inocular el consorcio de cianobacterias.

ANEXO B

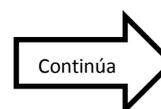
ANEXO 4: Resultados estadísticos complementarios.

La siguiente tabla muestra los valores de clorofila obtenidos cada cinco días para los 4 muestreos realizados. De este modo y utilizando las formulas escritas anteriormente, se obtiene el resultado del muestreo.

Tabla B. 1: Valores de clorofila obtenidos cada 5 días.

Medio	Días	Clorofila
BG110	5	10.3
BG110	5	3.69
BG110	5	10.32
BG110	10	9.16
BG110	10	4.78
BG110	10	11.94

Medio	Días	Clorofila
BG110	15	8.71
BG110	15	12.56
BG110	15	7.73
BG110	20	20.78
BG110	20	47.52
BG110	20	8.5
BG110N	5	11.94
BG110N	5	9.1
BG110N	5	3.87
BG110N	10	14.42
BG110N	10	10.58
BG110N	10	5.46
BG110N	15	14.57
BG110N	15	10.02
BG110N	15	5.53
BG110N	20	20.71
BG110N	20	13.6
BG110N	20	7.81
BG110NS	5	16.92
BG110NS	5	14.26
BG110NS	5	3.85
BG110NS	10	17.74
BG110NS	10	20.3
BG110NS	10	8.29
BG110NS	15	16.43
BG110NS	15	7.59
BG110NS	15	2.1
BG110NS	20	21.29
BG110NS	20	21.29
BG110NS	20	21.29
BG110S	5	8.84
BG110S	5	12.78
BG110S	5	8.47
BG110S	10	16.92
BG110S	10	17.67
BG110S	10	13.69
BG110S	15	12.15
BG110S	15	15.28
BG110S	15	13.66

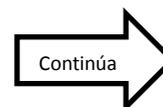


Medio	Días	Clorofila
BG110S	20	29.89
BG110S	20	19.45
BG110S	20	23.34

La siguiente tabla muestra los valores de carotenoides obtenidos cada cinco días para los 4 muestreos realizados. De este modo, y utilizando las formulas escritas anteriormente, se obtiene el resultado del muestreo.

Tabla B. 2: Valores de carotenoides obtenidos cada 5 días.

Medio	Días	carotenoides
BG110	5	0.64
BG110	5	0.35
BG110	5	0.61
BG110	10	0.82
BG110	10	0.91
BG110	10	0.56
BG110	15	0.96
BG110	15	2.24
BG110	15	0.46
BG110N	5	0.75
BG110N	5	0.84
BG110N	5	0.5
BG110N	10	1.07
BG110N	10	0.88
BG110N	10	0.56
BG110N	15	0.86
BG110N	15	0.95
BG110N	15	0.50
BG110NS	5	1.36
BG110NS	5	1.34
BG110NS	5	0.64
BG110NS	10	0.77
BG110NS	10	0.48
BG110NS	10	0.26



BG110NS	15	0.81
BG110NS	15	0.81
BG110NS	15	0.81
BG110S	5	0.97
BG110S	5	0.84
BG110S	5	0.63
BG110S	10	0.79
BG110S	10	1.16
BG110S	10	0.78
BG110S	15	1.68
BG110S	15	0.85
BG110S	15	1.10

ANEXO 5: Ensayo piloto 1. Prueba de Normalidad de varianzas para la variable clorofila ($\mu\text{g/ml}$).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Clorofila	48	0.00	5.97	0.90	0.0021

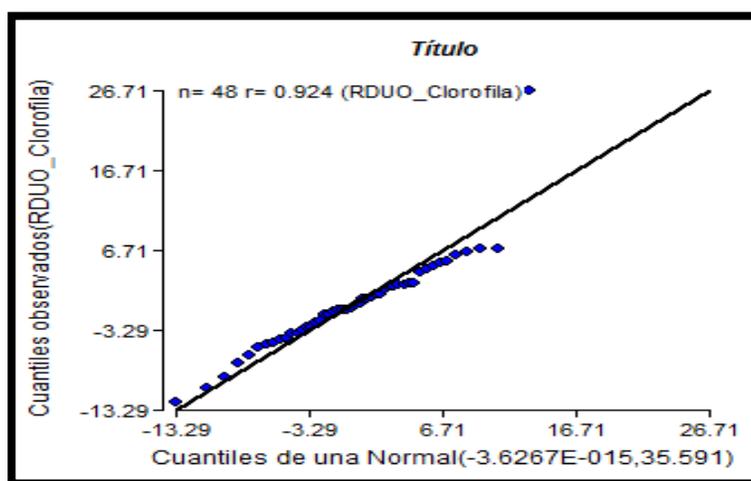


Figura A. 3: Gráfico Residuos versus predichos para la demostración de normalidad en la variable clorofila.

ANEXO 6: Ensayo piloto 1. Prueba de homogeneidad de varianzas para la variable clorofila (μ/ml).

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RABS Clorofila	48	0.12	0.00	107.16	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	107.91	6	17.99	0.95	0.4695
Medio	56.32	3	18.77	0.99	0.4055
Días	51.59	3	17.20	0.91	0.4446
Error	774.89	41	18.90		
Total	882.80	47			

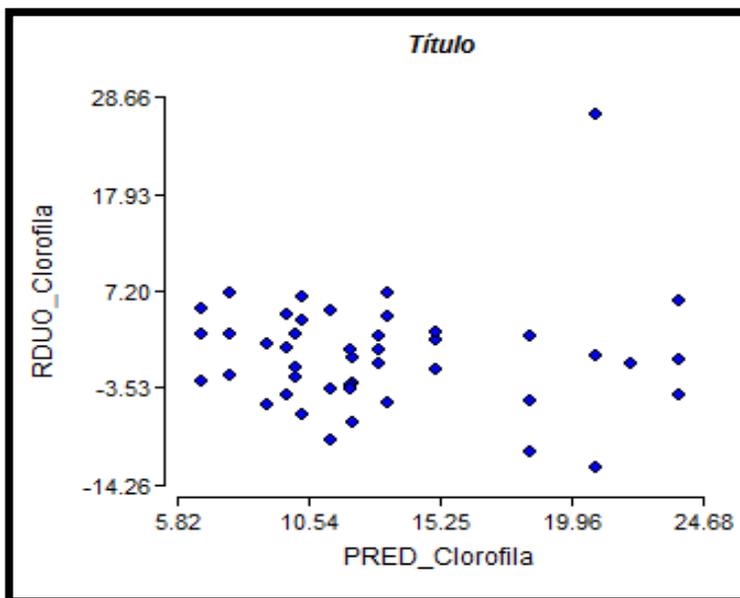


Figura A. 4: Gráfico de dispersión Residuos versus predichos para la demostración de homogeneidad en la variable clorofila.

ANEXO 7: Prueba no paramétrica de Normalidad para la variable clorofila (μ/ml).

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Medio	Días	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Clorofila BG110	5	3	3	8.10	3.82	10.30	24.30	0.0601
Clorofila BG110	10	3	3	8.63	3.61	9.16		
Clorofila BG110	15	3	3	9.67	2.55	8.71		
Clorofila BG110	20	3	3	25.60	19.95	20.78		
Clorofila BG110N	5	3	3	8.30	4.09	9.10		
Clorofila BG110N	10	3	3	10.15	4.50	10.58		
Clorofila BG110N	15	3	3	10.04	4.52	10.02		
Clorofila BG110N	20	3	3	14.04	6.46	13.60		
Clorofila BG110NS	5	3	3	11.68	6.91	14.26		
Clorofila BG110NS	10	3	3	15.44	6.33	17.74		
Clorofila BG110NS	15	3	3	8.71	7.23	7.59		
Clorofila BG110NS	20	3	3	21.29	0.00	21.29		
Clorofila BG110S	5	3	3	10.03	2.39	8.84		
Clorofila BG110S	10	3	3	16.09	2.11	16.92		
Clorofila BG110S	15	3	3	13.70	1.57	13.66		
Clorofila BG110S	20	3	3	24.23	5.28	23.34		

ANEXO 8: Prueba de Normalidad de varianzas para la variable carotenoides (μ/ml).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO carotenoides	36	0.00	0.35	0.89	0.0068

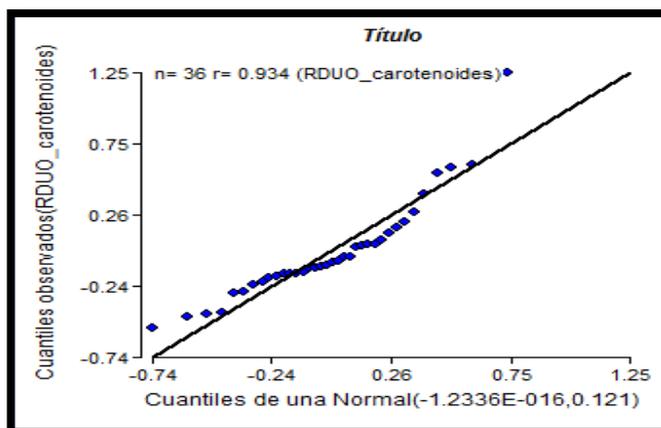


Figura A. 5: Gráfico Residuos versus predichos para la demostración de normalidad de la variable carotenoides.

ANEXO 9: Prueba de homogeneidad de varianzas para la variable carotenoides (μ/ml).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS carotenoides	36	0.10	0.00	100.88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.21	5	0.04	0.68	0.6426
Medio	0.14	3	0.05	0.75	0.5299
Días	0.07	2	0.04	0.57	0.5714
Error	1.85	30	0.06		
Total	2.06	35			

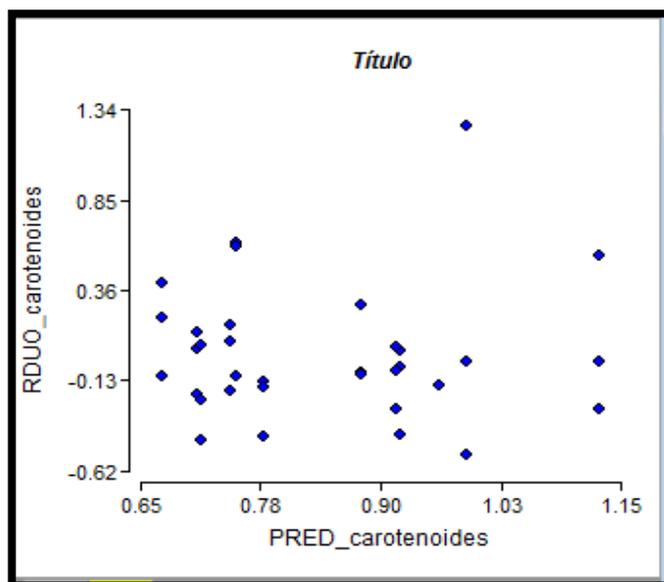


Figura A. 6: Gráfico de dispersión Residuos versus predichos para la demostración de homogeneidad en la variable carotenoides.

ANEXO 10: Ensayo piloto 1. Prueba no paramétrica de Normalidad para la variable carotenoides (μ/ml).

Prueba de Kruskal Wallis								
Variable	Medio	Días	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
carotenoides	BG110	5.00	3	0.53	0.16	0.61	13.76	0.2457
carotenoides	BG110	10.00	3	0.76	0.18	0.82		
carotenoides	BG110	15.00	3	1.22	0.92	0.96		
carotenoides	BG110N	5.00	3	0.70	0.18	0.75		
carotenoides	BG110N	10.00	3	0.84	0.26	0.88		
carotenoides	BG110N	15.00	3	0.77	0.24	0.86		
carotenoides	BG110NS	5.00	3	1.11	0.41	1.34		
carotenoides	BG110NS	10.00	3	0.50	0.26	0.48		
carotenoides	BG110NS	15.00	3	0.81	0.00	0.81		
carotenoides	BG110S	5.00	3	0.81	0.17	0.84		
carotenoides	BG110S	10.00	3	0.91	0.22	0.79		
carotenoides	BG110S	15.00	3	1.21	0.43	1.10		

ANEXO C

ANEXO 11: Definiciones y métodos estadísticos.

1. Análisis estadístico requisitos previos

Normalidad: los datos obtenidos en cada nivel del factor se ajustan razonablemente a una distribución Normal (gráficos y contrastes) Y_i sigue una distribución $N(\mu_i, \sigma)$ para cada i .

Homocedasticidad: la variabilidad de los datos en cada nivel del factor es similar (contraste de igualdad de varianzas) $\sigma^2 = \text{Var}(Y_i)$ igual para todo i

Linealidad: los residuos (diferencia de los datos a su media, en cada nivel del factor) se distribuyen alrededor del cero (gráfico de residuos) $E(U) = 0$.

Independencia: las observaciones se realizan de forma independiente unas de otras (diseño de la obtención de datos).

Estadística Paramétrica

Estadística paramétrica es la que requiere que los elementos que integran las muestras contengan parámetros medibles. La estadística paramétrica clásica plantea tres tipos de problemas:

- Estimación puntual en la que pretendemos dar un valor al parámetro a estimar.
- Estimación por intervalos (buscamos un intervalo de confianza)
- Contrastes de hipótesis donde buscamos contrastar información acerca del parámetro.

2. Estadística no Paramétrica

Estudia las pruebas y modelos estadísticos cuya distribución subyacente no se ajusta a los llamados criterios paramétricos. Su distribución no puede ser definida a priori, pues son los datos observados los que la determinan. La utilización de estos métodos se hace recomendable cuando no se puede asumir que los datos se ajusten a una distribución normal o cuando el nivel de medida empleado no sea, como mínimo, de intervalo (González, 2005).

3. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilks modificado)

Permite probar si la variable en estudio tiene distribución normal. Las hipótesis de la prueba son:

H_0 : las observaciones tienen distribución normal; versus

H_1 : las observaciones no tienen distribución normal

4. Análisis de la varianza

El Análisis de la Varianza (ANAVA), permite probar hipótesis referidas a los parámetros de posición (esperanza) de dos o más distribuciones. La hipótesis que se somete a prueba generalmente se establece con respecto a las medias de las poblaciones en estudio o de cada uno de los tratamientos evaluados en un experimento:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_a$ con $i=1, \dots, a$

donde a =número de poblaciones o tratamientos.

El ANAVA es un procedimiento que descompone la variabilidad total en la muestra (suma de cuadrados total de las observaciones) en componentes (sumas de cuadrados) asociados cada uno a una fuente de variación reconocida (Nelder, 1994; Searle, 1971, 1987).

En experimentos con fines comparativos, usualmente se realiza la aplicación de varios tratamientos a un conjunto de unidades experimentales para valorar y comparar las respuestas obtenidas bajo cada tratamiento. En este caso es deseable administrar eficientemente los recursos que permiten incrementar la precisión de las estimaciones de las respuestas promedio de

tratamientos y las comparaciones entre ellas. Se entiende por tratamientos a la/s acciones que se aplican sobre las unidades experimentales y que son objeto de comparación. Los tratamientos pueden ser representados por los niveles de un factor o por la combinación de los niveles de dos o más factores (estructura factorial de tratamientos).

Uno de los principales objetivos en la planificación de una experiencia, siguiendo un diseño experimental, es la reducción del error o variabilidad entre unidades experimentales que reciben el mismo tratamiento, con el propósito de incrementar precisión y sensibilidad al momento de la inferencia, por ejemplo aquello relacionado a la comparación de efectos de tratamientos.

El diseño experimental es una estrategia de combinación de la estructura de tratamientos (factores de interés) con la estructura de unidades experimentales (parcelas, individuos, macetas, etc.), de manera tal que las alteraciones en las respuestas, al menos en algún subgrupo de unidades experimentales, puedan ser atribuidas solamente a la acción de los tratamientos excepto por variaciones aleatorias. Así, es posible contrastar (comparar) medias de tratamientos o combinaciones lineales de medias de tratamientos con el menor “ruido” posible.

Modelo

Los datos a analizar pueden provenir de ensayos realizados bajo diferentes diseños experimentales (completamente aleatorizado, bloques completos al azar, bloques incompletos balanceados, cuadrado latino, crossover, parcelas divididas, anidados etc.) (Snedecor, 1956; Ostle, 1977; Di Rienzo, *et al.*, 2001).

5. Diseño completamente aleatorizado

Se supone que las unidades experimentales son homogéneas, es decir no tienen estructura alguna. Los tratamientos se asignan completamente al azar a las unidades experimentales. El archivo de datos debe contener al menos dos columnas, una identificando al tratamiento (variable de clasificación) y otra a la variable respuesta (variable dependiente). El número de repeticiones puede variar de un tratamiento a otro (González 2005).

6. Análisis de la varianza no paramétrico: Prueba de Kruskal-Wallis

Permite realizar un análisis de varianza no paramétrico a una vía de clasificación. El ANAVA propuesto por Kruskal y Wallis (1952) permite comparar las esperanzas de 2 o más distribuciones sin necesidad de realizar el supuesto de que los términos de error se distribuyen normalmente.

La hipótesis nula establece que $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_a$, donde μ_a representa la esperanza del i -ésimo tratamiento, con $i=1, 2, \dots, a$. Esta prueba se aplica cuando se tienen muestras independientes de cada población, con observaciones de naturaleza continua y las varianzas poblacionales son iguales.

El estadístico de la prueba (H) se basa en la suma de los rangos asignados a las observaciones dentro de cada tratamiento. Su distribución exacta es obtenida a partir de la consideración de todas las configuraciones posibles de los rangos de N observaciones en a grupos de n_i observaciones cada uno.

