

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

Almeida, Mónica

Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida, Sangolquí, Ecuador, 2014.

## 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 condiciones óptimas de escalado del consorcio que será inoculado en el ensayo final; los ensayos incluyen la determinación de la concentración adecuada de medio de cultivo, volumen óptimo de extracto de suelo para enriquecer el medio, 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. Se cuantificó clorofilas, carotenoides, peso seco y viabilidad de las cianobacterias cada cinco días durante el experimento. Los resultados obtenidos indican que la mayor producción se produjo con el medio BG11<sub>0</sub>+S presentando valores de 25 µg/ml de clorofila y 1.2 µg/ml de carotenoides. Las cianobacterias produjeron un crecimiento muy cercano con el medio BG11<sub>0</sub>. El segundo bioensayo se trabajó con dos volúmenes de extracto de suelo, obteniendo un óptimo crecimiento a 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 BG11<sub>0</sub> sin uso del stock III. En la 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 claves:** 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 BG11<sub>0</sub> + 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 BG11<sub>0</sub> 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.

**Keywords:** Cyanobacteria, consortia, microalgae, isolation, agricultural soils.

## INTRODUCCIÓN

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, 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)

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 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.

### Determinación de cuatro medios de cultivo sobre la preparación de biomasa del consorcio:

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 N03Na (2mM), medio BG110 + 1 ml extracto de suelo, medio BG110 + 1 ml extracto de suelo + 1 ml de N03Na (2mM).

### Efecto del tratamiento con biomasa del consorcio:

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.

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 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y agitación continua con un volumen de aire de  $0,8 \text{ L. m}^{-1}$ .

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

### 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  $27 \pm 2$  °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.

### **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 oscuridad para evitar la oxidación de la clorofila.

### **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.

### **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). 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.

### **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  $25 \pm 2$  °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.

## **RESULTADOS**

Al comparar el crecimiento en función a la edad del cultivo, se observa que este aumenta significativamente en el tiempo, 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 a se observó en el medio de cultivo BG110

con extracto de suelo (BG110+S) con 16.09 µg/ ml al día 5 y 24.22 µg/ ml al día 20.

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

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 µg/ ml y 1.21 µg/ ml en fase exponencial.

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).

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

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 1: 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.

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).

## DISCUSION

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<sub>2</sub>. 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 N<sub>03</sub>Na (2mM), medio BG110 + 1 ml extracto de suelo, medio BG110 + 1 ml extracto de suelo + 1 ml de N<sub>03</sub>Na (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 fuente de nitrógeno (nitrato de

sodio,  $\text{NaNO}_3$ ) con la finalidad de promover la fijación del  $\text{N}_2$  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 alguno 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 *Limnithrix* 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 NaNO<sub>3</sub>, 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*,

*Limnospira* sp, *Oscillatoria agardhii* y *Spirulina platensis*, 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/m<sup>2</sup>/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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en el medio de cultivo BG110 utilizado para el crecimiento del consorcio, el cual estuvo ausente de fuentes nitrogenadas (Manual, 1993).

## CONCLUSIONES

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.

Se logró el aislamiento de la cianobacteria *Calothrix* sp., utilizando la técnica de estriado en medio BG110 sólido y líquido.

*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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 electrónico internacional.*, 32.
- Aldave-Pajares, A. (1969). *Cushuro, algas azul-verdes como alimento en la región 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).*
- Cavalie, 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. Koenigsteim, 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 Olgún, 2., Olgún, 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 Disinfection.* 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.*