

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Anabaena* sp. DE
LA CAMARONERA SAN AGUSTÍN, MACHALA PROVINCIA
DE EL ORO, ECUADOR 2007 Y EVALUACIÓN DE SU
CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE
SAL”.

Previa a la obtención del Título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARÍA GABRIELA COELLO AGUILAR

SANGOLQUÍ, ENERO DEL 2008

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

María Gabriela Coello Aguilar

COORDINADORA DE LA CARRERA

Dra. Marbel Torres

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vinicio Zabala

Sangolquí, 28 de enero del 2008

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Sra. MARÍA GABRIELA COELLO AGUILAR como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

28 de enero del 2008

Fecha

M.Sc. Alma Koch
DIRECTORA

Mat. Luis C. Castillo C.
CODIRECTOR

REVISADO POR

Abg. Vinicio Zabala

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a toda mi familia, en especial a mis padres, hermanos y a mi esposo por su preocupación, apoyo y amor.

María Gabriela Coello Aguilar

AGRADECIMIENTO

Doy infinitas gracias a mi MADRE Y PADRE por su amor, apoyo, guía y sabiduría. A mi esposo por su amor y paciencia. A mis amigos (compañeros y profesores) por su amistad durante el transcurso de la carrera, en especial a M. Sc. Alma Koch y Matemático Luis C. Castillo C. por su sabia guía y constante apoyo. Y a la Escuela Politécnica del Ejército por haberme dado la oportunidad de estudiar y crecer en sus aulas.

Gracias.

María Gabriela Coello Aguilar

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
LISTADO DE TABLAS.....	ix
LISTADO DE FIGURAS.....	x
LISTADO DE ANEXOS.....	xiii
NOMENCLATURA UTILIZADA.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULOS	
1 CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 Marco teórico.....	7
1.4.1 Aislamiento, purificación e identificación de microalgas.....	7
1.4.1.1 Aislamiento.....	7
1.4.1.2 Purificación.....	7
1.4.1.3 Caracterización.....	7
1.4.2 Cianobacterias.....	8
1.4.2.1 Características generales.....	8
1.4.3 Género <i>Anabaena</i> , generalidades.....	10
1.4.3.1 Factores que favorecen el desarrollo de la <i>Anabaena</i> sp.	14
1.4.4 El cultivo de camarones, aspectos generales.....	16
1.4.4.1 Cultivo de camarones.....	16
1.4.4.2 . Situación actual del camarón ecuatoriano.....	17
1.4.5 Uso de microalgas en la alimentación de camarones.....	18
1.5 Hipótesis.....	21

1.5.1 Hipótesis general.....	21
2 CAPÍTULO: MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 Colaboradores.....	22
2.2 Zona de estudio.....	23
2.3 Período de investigación.....	23
2.4 Diseño.....	23
2.5 Metodología.....	24
2.5.1 Toma de muestra de <i>Anabaena</i> sp.	24
2.5.2 Constatación de la presencia de <i>Anabaena</i> sp. y Cultivo mixto....	24
2.5.3 Aislamiento y caracterización de la <i>Anabaena</i> sp.	24
2.5.4 Cuantificación de la biomasa microalgal.....	26
2.5.5 Obtención y cuantificación de proteínas totales, clorofila a, y exopolisacáridos de <i>Anabaena</i> sp. cultivada a 5g/L de sal.....	28
2.6 Análisis de datos.....	29
3 CAPÍTULO: RESULTADOS	30
3.1 Crecimiento de <i>Anabaena</i> sp.	30
3.2 Curva de crecimiento poblacional de <i>Anabaena</i> sp.	35
3.2.1 Tratamiento 1 (0g/L de sal).....	35
3.2.2 Tratamiento 2 (5g/L de sal).....	40
3.2.3 Tratamiento 3 (10g/L de sal).....	44
3.2.4 Tratamiento 4 (15g/L de sal).....	46
3.2.5 Tratamiento 5 (20g/L de sal).....	46
3.3 Caracterización de <i>Anabaena</i> sp.	48
4 CAPÍTULO: DISCUSIÓN	52
4.1 Crecimiento de <i>Anabaena</i> sp.	52
4.2 Curva de crecimiento poblacional de <i>Anabaena</i> sp.	52
4.3 La <i>Anabaena</i> sp. como alimento para camarón.....	53

4.4 Caracterización de <i>Anabaena</i> sp.	54
5 CAPÍTULO: CONCLUSIONES	55
6 CAPÍTULO: RECOMENDACIONES	57
7 CAPÍTULO: BIBLIOGRAFÍA	58

LISTADO DE TABLAS

Página

Tabla 2.1 Tratamientos y número de réplicas utilizados en el crecimiento de <i>Anabaena</i> sp.	23
Tabla 3.1 Densidad celular obtenida por réplica en cada tratamiento durante el ciclo de vida de la <i>Anabaena</i> sp. en 30 días de cultivo.....	31
Tabla 3.2 Resultados ANOVA de la densidad celular de <i>Anabaena</i> sp. entre tratamientos por día.....	32
Tabla 3.3 ANOVA con dos factores de la densidad celular de <i>Anabaena</i> sp. con tres muestras por grupo.....	33
Tabla 3.4 Promedios de densidad celular durante el ciclo de vida de <i>Anabaena</i> sp.	34

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 <i>Anabaena</i> sp. con un heterocisto rodeado de células vegetativas 40x	11
Figura 1.2 <i>Anabaena</i> sp. con heterocistos ubicados intercaladamente 40x.....	11
Figura 1.3 Acinetos en <i>Anabaena</i> sp. (a) <i>Anabaena</i> CA en ausencia de nitrógeno con heterocistos esparcidos a intervalos a lo largo del filamento y un proheterocisto (flecha). (b) <i>Anabaena</i> CA en presencia de nitrato (17uM) muestra una inhibición en el desarrollo de heterocistos. (c) <i>A. cilíndrica</i> en ausencia de nitrógeno. Un único proheterocisto (p) y muchos heterocistos (flechas), también se observa acinetos en uno y a ambos lados de los heterocistos. (d) Parte de un filamento de <i>A cilíndrica</i> con un heterocisto con acinetos en ambos lados. Todos en campo de contraste, excepto la c, la cual se encuentra en campo claro (Carr et al., 1982).....	12
Figura 2.1 Cámara de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. donde se controla la temperatura, luz 12:12h y aireación (1cm=11.44cm).....	25
Figura 3.1 Curva de crecimiento promedio de <i>Anabaena</i> sp. del tratamiento 1 (0g/L de sal).....	35
Figura 3.2 Curva de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. ajustada por regresión cúbica (verde), cuadrática (rosada) y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 1 (0g/L de sal) azul.....	36
Figura 3.3 Curva del acumulado de la densidad celular del tratamiento 1 (0g/L de sal).....	37
Figura 3.4 Curva de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. ajustada con la primera derivada de la ecuación Logística (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 1 (0g/L de sal) azul	38

Figura 3.5 Curva de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. ajustada con la función tipo Gaussiana o tipo normal (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 1 (0g/L de sal) azul	39
Figura 3.6 Curva de crecimiento promedio de <i>Anabaena</i> sp. del tratamiento 2 (5g/L de sal).....	40
Figura 3.7 Curva de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. ajustada por regresión cúbica (verde), cúbica (rosada) y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 2 (5g/L de sal) azul.....	41
Figura 3.8 Curva del acumulado de la densidad celular del tratamiento 2 (5g/L de sal).....	42
Figura 3.9 Curva de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. ajustada con la primera derivada de la ecuación Logística (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 2 (5g/L de sal) azul.....	43
Figura 3.10 Curva de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. ajustada con la función tipo Gaussiana o tipo normal (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 2 (5g/L de sal) azul.....	44
Figura 3.11 Curva de crecimiento promedio de <i>Anabaena</i> sp. del tratamiento 3 (10g/L de sal).....	45
Figura 3.12 Curva de crecimiento promedio de <i>Anabaena</i> sp. del tratamiento 4 (15g/L de sal).....	46
Figura 3.13 Curvas de crecimiento promedio de <i>Anabaena</i> sp. de los tratamientos 1 (0g/L de sal), 2 (5g/L de sal), 3 (10g/L de sal), 4 (15g/L de sal), 5 (20g/L de sal).....	47
Figura 3.14 Diámetro de células vegetativas de <i>Anabaena</i> sp. en lente 40x (10 unidades=25 µm). Las flechas negras indican las células terminales cónicas y las flechas blancas indican los heterocistos intercalados a lo largo del tricoma.....	48

Figura 3.15 Morfología de colonias de *Anabaena* sp. a) Crecimiento de colonias en medio sólido. b) Colonia vista en lente 10x, se aprecian los tricomas rectos y ligeramente sinuosos.....49

Figura 3.16 Crecimiento de *Anabaena* a distintas concentraciones de sal. a) Inhibición del crecimiento de *Anabaena* a 20g/L de sal (tratamiento 5). b) Supervivencia o tolerancia de *Anabaena* a 15g/L de sal (tratamiento 4). c) Crecimiento óptimo de *Anabaena* entre 0 y 5g/L de sal (tratamiento 1 y 2).....50

LISTADO DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Dinámica del crecimiento de algas (Cedillo et al., 1994).....	65
Anexo 2: Fórmula de medio BG-11 ₀ utilizado para el crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. (Rippka, 1979)	66
Anexo 3: Desarrollo de <i>Anabaena</i> sp. a distintas concentraciones de sal.....	67
Anexo 4: Determinación de proteínas en <i>Anabaena</i> sp. (Lowry modificado por Hebert, 1971).....	70
Anexo 5: Determinación de clorofila a en <i>Anabaena</i> sp.	72
Anexo 6: Determinación de exopolisacáridos en <i>Anabaena</i> sp.	73
Anexo 7: Tabla de ANOVA de la densidad celular de <i>Anabaena</i> sp. entre tratamientos por día.....	74
Anexo 8: Tabla de comparaciones múltiples según Sheffé de la densidad celular de <i>Anabaena</i> sp. entre tratamientos por día	75
Anexo 9: Tabla de comparaciones múltiples LSD de la densidad celular de <i>Anabaena</i> sp. entre tratamientos por día	76

NOMENCLATURA UTILIZADA

Aislamiento: Separación de un microorganismo de su medio natural o de microorganismos distintos.

Balanceado: Alimento producido industrialmente para animales.

Biofertilizantes: Organismos vivos que son usados en agricultura como fertilizantes. Son naturales y no contaminantes para el medio ambiente.

Bloom: Crecimiento denso de algas planctónicas que le dan un color característico a la masa de agua.

Caracterización: Recopilación de los datos básicos de microorganismos para su identificación.

Ciclo de Calvin: Serie de reacciones bioquímicas mediante las cuales el anhídrido carbónico es reducido e incorporado en moléculas orgánicas.

Exopolisacáridos: Carbohidratos formados por tres o más azúcares simples, localizados fuera de la pared bacteriana.

Fitoplancton: Conjunto de los organismos acuáticos autótrofos, que tienen capacidad fotosintética y que viven dispersos en el agua.

Inhibición: Es la suspensión de una función o actividad del organismo mediante la activación de un estímulo.

Microalgas: Organismos fotoautótrofos obligados, es decir, requieren de la energía proveniente de la luz para realizar sus procesos biológicos. Forman parte del fitoplancton.

Tolerancia: Capacidad de un organismo para soportar factores ambientales o

artificiales.

Tricoma: Conjunto formado por las células ordenadas de forma lineal de una Cianobacteria filamentosa.

ANOVA: Acrónimo de Análisis de la Varianza. Es una prueba estadística desarrollada para realizar simultáneamente la comparación de las medias de más de dos poblaciones.

Scheffé: Procedimiento de comparaciones múltiples, útil para examinar todas las posibles combinaciones lineales de medias de grupo, en lugar de comparar sólo por parejas.

LSD (Least significance level): Procedimiento de comparación múltiple que se basa en el estadístico t de Student. Nivel de significación observado que se ajusta teniendo en cuenta el hecho de que se están realizando múltiples comparaciones.

Crecimiento poblacional: Fenómeno biológico y natural que está íntimamente ligado con la capacidad reproductiva de los seres vivos.

RESUMEN

Se reporta el aislamiento y la caracterización de la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. colectada de la camaronera San Agustín de la ciudad de Machala, Provincia de El Oro, Ecuador. Se evaluó su crecimiento a distintas concentraciones de sal (0g/L, 5g/L, 10g/L, 15g/L y 20g/L) estimados por conteo en cámara de Neubauer. Se cuantificó clorofila a, proteínas y exopolisacáridos como parte de la caracterización. Los bioensayos por triplicados se mantuvieron durante 30 días, entre los meses mayo y junio, a $30.32 \pm 1.37^\circ\text{C}$ de temperatura, con un fotoperiodo de 12:12h, con aireación constante, control de pH y niveles de oxígeno hasta la fase de muerte. La cianobacteria *Anabaena* sp., fijadora de nitrógeno, optimiza su producción de biomasa a 5g/L de sal cuya densidad celular máxima es de $8169.91 \text{cél}/\mu\text{L}$ cultivada en medio BG-11₀, de esta forma se rechaza lo planteado inicialmente como mayor densidad celular a 10g/L de sal. Presenta inhibición de crecimiento a 20g/L de sal y sobrevive a 10 y 15g/L. La curva de crecimiento en concentraciones de 0 y 5g/L se definió con la ecuación de tipo Gaussiana, donde se establecen las fases de crecimiento. Las concentraciones de proteínas y clorofila a, cuantificadas en el cultivo de 5g/L fueron $10.16\text{E}-06 \pm (3.85\text{E}-06\mu\text{g al } 95\%)$ y $0.51\text{E}-06 \pm (0.12\text{E}-06\mu\text{g al } 95\%)$ por célula respectivamente y no se obtuvo producción de exopolisacáridos. El sector camaronero contaría con la opción de la *Anabaena* sp. aislada, caracterizada, con curva de crecimiento poblacional definida e información de tolerancia salina y óptima para estudios y aplicaciones como fuente de alimento y crecimiento para camarón.

Palabras clave: Cianobacteria, *Anabaena* sp., caracterización, crecimiento poblacional, salinidad, densidad celular.

ABSTRACT

The isolation and characterization of filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. collected at the San Agustin shrimp farm at Machala city, Ecuador is reported here. The influence of salinity concentrations (0g/L, 5g/L, 10g/L, 15g/L and 20g/L) on growth was studied, and this cell count was accomplished by using a Neubauer camera. The chlorophyll a, protein and exopolysaccharides (EPS) were measured as part of the characterization. Culture studies were carried out using 3 replicas during 30 days between May and June, with a temperature of $30.32 \pm 1.37^\circ\text{C}$, a photoperiod of 12:12h, constant aeration, pH and oxygen control up to the death phase. The nitrogen fixing, cyanobacterium *Anabaena* sp. optimizes its biomass production to a maximum cellular density of 8169.91 cel/ μL at 5g/L of salinity concentration in BG-11₀ medium. That is why, the premise of highest density at 10g/L is rejected. The *Anabaena* inhibits its growth at 20g/L and survives at 10 and 15g/L of salinity. The population growth curve for cultures at 0 and 5g/L was defined by the Gaussian equation, where the growth phases were established. Protein and chlorophyll values at 5g/L of salinity were $10.16\text{E}-06 \pm (3.85\text{E}-06\mu\text{g al } 95\%)$ and $0.51\text{E}-06 \pm (0.12\text{E}-06\mu\text{g al } 95\%)$ per cell respectively and there were not production of exopolysaccharides. Shrimp farms have the isolated, characterized *Anabaena* sp. with a defined population growth curve, optimum salinity and tolerance levels for studies and applications as a good source of food and growth patterns for shrimp.

Key words: Cyanobacterium, *Anabaena* sp., characterization, population growth curve, salinity, cell density.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

En la industria camaronera en Ecuador, uno de los gastos más importantes es el alimento (balanceado) utilizado para el crecimiento del camarón, el cual significa alrededor del 40% del valor de su venta (Tobey, 1998). Esto ha provocado en los productores un interés creciente por alimentos alternativos como Artemias, levaduras marinas, bacterias, microalgas (fitoplancton) ó zooplancton para así reducir los costos de producción.

En la actualidad ya se han aplicado microalgas como fuente alimenticia en camarones, peces, crustáceos, moluscos (De Pauw y Persoone, 1988) y como biofertilizantes, acondicionadores de suelo y purificadores de aguas residuales (Boussiba, 1988). Las microalgas más frecuentemente cultivadas y utilizadas en acuicultura como alimento de organismos marinos, son: *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp. *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaedactylum tricordatum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracili* (Le Borgne, 1990 en Santacruz, 1999).

La *Anabaena* sp., forma parte del fitoplancton, el cual tiene gran importancia en la acuicultura, esto se debe a su posición en la pirámide alimenticia (Coll, 1983 en Cedillo et al., 1994), y a su alto contenido proteico que va del 40% al 65% en peso seco (Albarracín, 2005). El crecimiento de esta cianobacteria ha sido observado en la camaronera Bellamar ubicada en la parroquia Barbones, cantón El Guabo, provincia de El Oro, donde se constató un mayor crecimiento en camarones *Litopenaeus vannamei* en las piscinas que contenían *Anabaena* sp. (Romero, 2006 comunicación personal), sin embargo se desconoce las características taxonómicas y biológicas como la salinidad propicia para su crecimiento y supervivencia. Establecer estos parámetros básicos facilitará el estudio *in situ* sobre la factibilidad del uso de la cianobacteria como suplemento alimenticio en camarones ó aplicaciones industriales.

1.2 Justificación del problema

La *Anabaena* sp. en ambientes marinos, requiere de factores óptimos como la sal para su desarrollo. El encontrar una concentración de sal óptima con la cual haya una mayor producción de biomasa (mayor crecimiento poblacional), permitiría establecer parámetros básicos para desarrollar estudios *in situ* sobre la factibilidad del uso de la cianobacteria como suplemento alimenticio en camaronerías. La salinidad en las piscinas camaronerías varía en invierno por las constantes lluvias, esta puede fluctuar de 8g/L a 28g/L y en verano de 28g/L a 32g/L, sin embargo, estas fluctuaciones no afectan al *Litopenaeus vannamei* ya que soportan un amplio rango de salinidad, de 2 a 40g/L (Romero, 2006 comunicación personal y Sowers et al., 2006) pero en *Anabaena* sp. se ha comprobado una inhibición en su crecimiento a 20g/L (Moisander et al., 2002). Otros factores como pH y temperatura no influyen en gran manera en el crecimiento de la *Anabaena* ya que este se mantiene sostenido entre pH de 6.0 – 8.0 y al tener las piscinas camaronerías un promedio de pH 7.75 ± 0.25 no es un parámetro que pueda estar afectando su crecimiento, de igual manera la temperatura en las piscinas camaronerías tiene un promedio de $30.20 \pm 1.73^\circ\text{C}$ ¹ y con la que se trabaja en cultivos de *Anabaena* es de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Morales et al., 2002), por lo tanto es otro parámetro que no influiría mayormente en el desarrollo de esta cianobacteria. No se ha estudiado la influencia del O₂ en el crecimiento de *Anabaena* sp., aunque en otras especies como *Phaedodactylum tricornerutum* se ha observado un aumento de densidad celular con ingreso de aire (Abalde et al., 1995). En cultivos con *Anabaena* se trabaja con aireación constante, de esta forma sus niveles de O₂ se asemejarían a los encontrados en piscinas camaronerías: 5.09 ± 0.5 mg/L en la mañana y 10.36 ± 1.14 mg/L en la tarde, por lo tanto sería un parámetro controlado que no afectaría el crecimiento de la *Anabaena* sp. Estos valores promedios de pH, temperatura y oxígeno disuelto de las piscinas camaronerías son utilizados durante el crecimiento de la *Anabaena* sp. pero se evalúa su crecimiento únicamente con variación de concentraciones de sal.

Actualmente se busca opciones para mejorar la producción a bajos costos en las camaronerías. En el sector acuícola, la industria camaronería ha sido golpeada fuertemente en estos últimos años. Uno de los golpes más fuertes fue la mancha blanca, enfermedad causada por el virus WSSV (White Spot Syndrome Virus) que se caracteriza por afectar un

¹ Los valores promedios de pH, temperatura y oxígeno disuelto son de piscinas de cultivo de la camaronería Bellamar, ubicada en la Provincia de El Oro.

rango amplio de tejidos blancos como el tejido epitelial, conectivo, hematopoyético y hemocitos (principales efectores de la respuesta inmune en los crustáceos). En 1999 llegó a causar mortalidades en el camarón de hasta el 100%, lo cual trajo grandes pérdidas a este sector (Maldonado et al., 2004). Posteriormente, en el 2001, el precio del camarón ecuatoriano bajó un 22% en relación al año anterior, agudizándose la crisis del sector camaronero (FIRI, 2005).

El producir un camarón de mayor peso a menor tiempo e inversión es el principal objetivo de las camaroneras. Uno de los gastos más importantes es la compra del balanceado el cual significa alrededor del 40% del valor de la venta del camarón (Tobey, 1998) y, por tal razón, además del balanceado, algunas granjas acuícolas actualmente inoculan *Artemias*, levaduras marinas, bacterias, microalgas (fitoplancton) y/o zooplancton para así reducir estos costos. Sin embargo, cada especie de camarón presenta preferencias alimenticias distintas. El *Litopenaeus vannamei*, que domina el 95% en la industria camaronera (FIRI, 2005), es quizá una de las especies menos carnívora, por lo que probablemente depende más del fitoplancton. Además, el fitoplancton es responsable por la fotosíntesis, que es la principal fuente de oxígeno en los sistemas de cultivo sin aireación. Otro punto a favor del fitoplancton es que evita la acumulación de compuestos potencialmente tóxicos tales como amonio y nitritos al utilizarlos en su metabolismo (Bonilla, 2002).

Las microalgas tienen gran importancia en la acuicultura y esto se debe a su posición en la pirámide alimenticia (Coll, 1983 en Cedillo et al., 1994) debido a la capacidad de convertir sales inorgánicas en compuestos orgánicos con ayuda de la luz. Las microalgas son organismos imprescindibles en la producción de alimento (Hedí, 1956; Tamiya, 1957; Tamiya, 1960; Starr, 1971 en Cedillo et al., 1994). Otra característica de las microalgas que impulsa su utilización en el área acuícola es su alto contenido proteico que va del 40% al 65% en peso seco (Albarracín, 2005).

Se ha observado (Romero, 2006 comunicación personal) un incremento en el peso del camarón de 1.11g por semana en piscinas con proliferación de *Anabaena* sp. en la camaronera Bellamar ubicada en la parroquia Barbones, cantón El Guabo, provincia de El Oro. Sin embargo, al aumentar la salinidad de estas piscinas se inhibió el crecimiento de *Anabaena* sp. Otras observaciones realizadas por el Ingeniero Aguilar Miguel y el

Ingeniero Orellana Fermín, biólogos de distintas camaroneras, se suman para confirmar un incremento en el peso del camarón en presencia de *Anabaena* sp., por tal razón la camaronera Bellamar ubicada en la Provincia de El Oro está interesada en estudiar la *Anabaena* sp. debido a que significaría una fuente alimenticia alternativa.

Las proteínas son el principal componente de la dieta suministrada al cultivo de camarón, se las utiliza como fuente de energía metabólica y su requerimiento es elevado tanto en la fase de postlarva como en la fase juvenil, esto es, mayor al 30% (Rosas, 2003), es decir que prácticamente en todo el ciclo que cumplen los camarones dentro del período de cultivo mantienen elevados requerimientos proteicos. La *Anabaena* sp. se caracteriza por tener altas concentraciones de proteína, un ejemplo es la *Anabaena cilíndrica*, cuyo contenido proteico va del 43% al 56% en peso seco (Abalde et al., 1995). Se puede lograr un bloom de microalgas en las piscinas manejando las condiciones óptimas para su crecimiento y al ser su contenido proteico elevado ayudaría a cubrir los requerimientos del camarón.

La presencia de cianobacterias dan un “olor a choclo” o “tierra” en sistemas de cultivo de camarón (Ortiz, 2003) cuando se alcanzan concentraciones elevadas (Norstog, 1976 en Jiménez, 1983), pero para eliminarlas se realizan recambios de agua o aplicaciones de sulfato de cobre (Boyd y Tucker, 1998), además al eliminar el bloom de microalgas quince días antes de la cosecha del camarón, descarta el “olor a choclo” no deseado (Romero, 2006 comunicación personal) y así, se cumplen 120 días de alimentación proteica a base de microalgas.

La aplicación de *Anabaena* sp. en el cultivo de camarón resultaría beneficioso sobre todo por su alto contenido proteico además de carbohidratos y lípidos, operando siempre a la par un manejo cuidadoso de la eliminación de *Anabaena* previo a la cosecha del camarón. Para lograr la aplicación de esta microalga en los sistemas de cultivo de camarón se requiere primeramente aislarla y caracterizarla, esto es lo que se pretende alcanzar, además de evaluar su crecimiento a distintas concentraciones de sal lo que ayudaría a determinar las condiciones apropiadas para su crecimiento. En la caracterización de la *Anabaena* se hizo uso de la guía dada en el Manual de Bergey (Boone y Castenholz, 2001).

Este proyecto también incluye la comprobación de componentes sintetizados como clorofila a y exopolisacáridos del tratamiento con mayor crecimiento de *Anabaena* sp. ya que estos productos determinan la actividad metabólica y la capacidad de formación de biofilms respectivamente.

Finalmente, el proyecto, podrá ser utilizado como piloto, previo a su aplicación en la industria camaronera y así mejorar la producción en el sector acuícola.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar a la *Anabaena* sp. de la camaronera San Agustín, Machala Provincia de El Oro, Ecuador 2007 y evaluar su crecimiento poblacional en función de la concentración de sal.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar a la *Anabaena* sp. para purificarla en un medio de cultivo a fin de llevar a cabo el proyecto.
- Caracterizar morfológicamente a la *Anabaena* sp.
- Definir la curva de crecimiento poblacional de *Anabaena* sp. a distintas concentraciones de sal.
- Caracterizar a la *Anabaena* sp. mediante la evaluación de la cantidad de proteínas, clorofila a y exopolisacáridos a la concentración de sal donde se presente mayor densidad celular.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Aislamiento, purificación y caracterización de microalgas.

1.4.1.1 Aislamiento

Para obtener cepas de microorganismos se las puede aislar del medio natural u obtenerlas de universidades, centros de investigación que suelen tener colecciones de cultivos. Para propósitos comerciales es preferible aislar a los microorganismos del medio, es decir que no provengan de otras fuentes ya que las especies locales estarán adaptadas a las condiciones particulares del medio (Ayala y Laing, 1990).

1.4.1.2 Purificación

Los microorganismos viven en poblaciones mixtas, es decir, conviven entre varias especies, este hecho dificulta el estudio adecuado de un microorganismo que se encuentra creciendo en cultivo mixto por lo cual se hace necesario el cultivo puro de la especie a analizarse. La purificación de la cianobacteria *Anabaena* se la puede realizar fácilmente en medio sólido (BG11₀ o Z8₀ suplementado con NaHCO₃) y con micromanipulación de filamentos (Rippka, 1979). Para mejorar la purificación se puede aplicar un proceso de lavado previo a la siembra (Rippka, 1988 en Boone y Castenholz, 2001).

1.4.1.3 Caracterización

Cada microorganismo tiene características específicas para ser identificado.

Dentro del Manual de Bergey (Boone y Castenholz, 2001) se describen las características que la *Anabaena* sp. posee, Como son:

- Tricomas profunda o ligeramente sinuosos.
- Células vegetativas esféricas, cilíndricas, o en forma de barril y separadas por constricciones visibles en la pared celular.
- Los heterocistos se encuentran predominantemente en forma intercalada, aunque pueden estar en los extremos del microorganismo.

- Los acinetos se los puede encontrar separados o agrupados (2-3), junto a heterocistos o distantes de ellos.
- La membrana no es firme pero la producción de mucilágeno puede ser abundante.
- Generalmente no se observan bifurcaciones falsas.

Estas características citadas son utilizadas para la caracterización morfológica de la *Anabaena* sp.

1.4.2 Cianobacterias

Las cianobacterias son microorganismos que comparten características de bacterias y algas, lo cual ha hecho que su denominación sea un poco confusa, sin embargo sus particularidades como célula procariota confirmaron su ubicación dentro del reino procarionte (Staley, 1989).

1.4.2.1 Características generales

Se cree que las cianobacterias han evolucionado durante el inicio del período precámbrico y durante su existencia han colonizado casi toda el agua dulce, marina y el hábitat terrestre. Algunas cianobacterias viven en hábitat extremos como temperaturas de hasta 70°C, lagos hipersalinos, y desiertos calientes y fríos (Reynolds y Walsby, 1975 en Wehr y Sheath, 2003). En el anexo 1 se observa la dinámica de crecimiento.

Históricamente, la clasificación de las cianobacterias se ha basado en simples características morfológicas. Además muchos bacteriólogos han aplicado propiedades fisiológicas y bioquímicas para las especies en cultivo. Durante las últimas cuatro décadas, las características ecológicas, ultraestructurales y evidencias moleculares han ayudado al conocimiento de este grupo. Como resultado, su clasificación ha tenido cambios radicales (Wehr y Sheath, 2003). Aunque hasta la actualidad su clasificación por morfología celular no ha sido reemplazado por ningún otro criterio.

Las cianobacterias, aún siendo procariotas verdaderos, poseen un sistema semejante al de las células eucariotas por su contenido de clorofila a, por llevar a cabo la

fotosíntesis con la producción de oxígeno además del fotosistema II² que realiza. También tienen similitud con las algas rojas por los pigmentos accesorios que utilizan como las ficobiliproteínas.

Poseen el ciclo de Calvin, el ciclo del ácido cítrico (funcionalmente incompleto por falta de la enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa), y la ruta de las pentosas fosfato. Sin embargo en las cianobacterias no se puede generalizar con respecto a sus características ya que al ser un grupo tan grande hay especies que bajo ciertas condiciones actúan de distinta manera. Por ejemplo la *Oscillatoria limnetica* bajo condiciones anaeróbicas realiza fotosíntesis anoxigénica. También existe otro grupo de cianobacterias que fijan nitrógeno para lo cual requieren de heterocistos (células especializadas en la captación y fijación de nitrógeno), sin embargo su número en el microorganismo se reduce con el aumento de concentración de nitrato en el medio en el que crece (Loreto y Morales, 2003a).

Se puede encontrar a las cianobacterias como células individuales o formando filamentos. Poseen pigmentos, característica que aumenta la importancia de este microorganismo en el área industrial. Entre los pigmentos están la clorofila a, la ficocianina, la ficoeritrina y los carotenoides, además produce proteínas, enzimas, exopolisacáridos, y algunas cianobacterias producen toxinas. Las cianobacterias también se caracterizan por poseer altos porcentajes de proteínas, una de ellas es la *Spirulina maxima* que contiene del 60% al 70% de proteínas en base seca (Abalde et al., 1995). Actualmente se la está utilizando como alimento para camarón en fase larval (Jaime, 2004).

Por su rapidez en la reproducción, las cianobacterias suelen ocasionar blooms (crecimiento masivo explosivo), los cuales dependiendo del tipo pueden producir toxinas, la *Anabaena* es una de ellas, sin embargo Massaut y Ortiz (2002) no encontró producción de toxicidad bajo condiciones de bioensayo, por lo que recomienda caracterizar la toxicidad ya que una simple identificación de una cianobacteria no es suficiente para determinar su toxicidad debido a que cepas con diferente toxicidad pueden pertenecer a una misma especie. En el caso de producir toxinas, el bloom de microalgas puede ser eliminado con recambios de agua o aplicaciones de sulfato de cobre (Boyd y Tucker,

² Conjunto de pigmentos empaquetados en el tilacoide que aprovecha la clorofila a conocida como P680 (Raisman, 2004)

1998). Además, no se han reportado daños en el camarón expuesto a toxinas producidas por cianobacterias.

Un número elevado de cianobacterias tienen relaciones simbióticas con protozoos y hongos. En especial las especies que fijan nitrógeno suelen asociarse con plantas. Una de las asociaciones más importantes es la de *Azolla* - *Anabaena* la cual se la utiliza como bioabono en el cultivo de arroz (Montaño, 2005).

Entre las especies de microalgas de interés económico están: *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Tolypothrix*, *Gomphosphaeria*, *Scytonema* (Abalde et al., 1995).

1.4.3 *Anabaena*, generalidades

La *Anabaena* es una cianobacteria filamentosa. Posee células cilíndricas o en forma de barril con diámetros de 3 a 6 μm y estas se encuentran separadas por constricciones en la pared celular. Tiene tricomas profunda o ligeramente sinuosos.

La reproducción de la *Anabaena* sp puede ocurrir por la fragmentación de los tricomas de forma aleatoria. Otra característica de la *Anabaena* es la presencia de heterocistos los cuales se desarrollan a partir de células vegetativas y pueden encontrarse en hilera, en pares o solos (Figura 1.1). Poseen una pared celular ancha, con muchas capas y son aparentemente herméticos. Los heterocistos sintetizan la enzima nitrogenasa, la cual permite la fijación del nitrógeno atmosférico o disuelto en agua (N_2) bajo condiciones anaeróbicas, el cual se mantiene dentro del heterocisto. La forma y la ubicación de los heterocistos en el tricoma está, aparentemente, determinada genéticamente, pero la frecuencia en los tricomas dentro de la población depende del suplemento de nitrógeno en el medio ambiente, el cual disminuye con elevados niveles de NH_4^+ o NO_3^- . En la *Anabaena*, los heterocistos se desarrollan exclusivamente en la parte apical o terminal de las células vegetativas o intercaladamente (Figura 1.2).

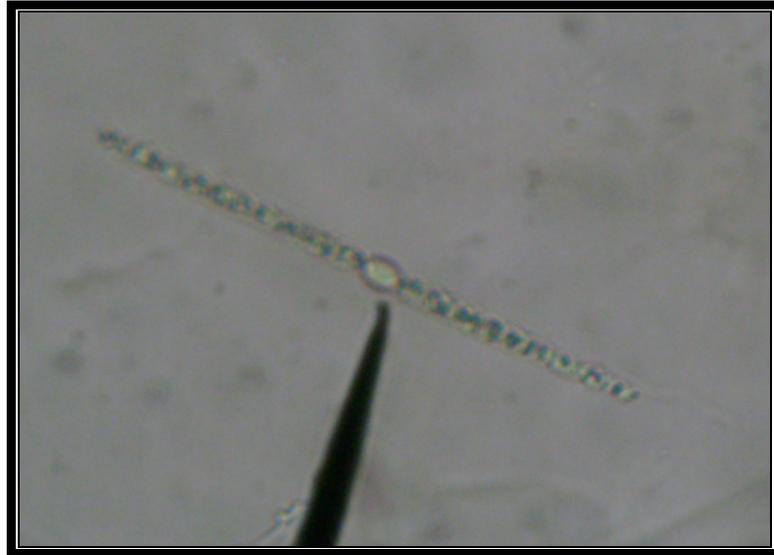


Figura 1.1 *Anabaena* sp. con un heterocisto rodeado de células vegetativas 40x.

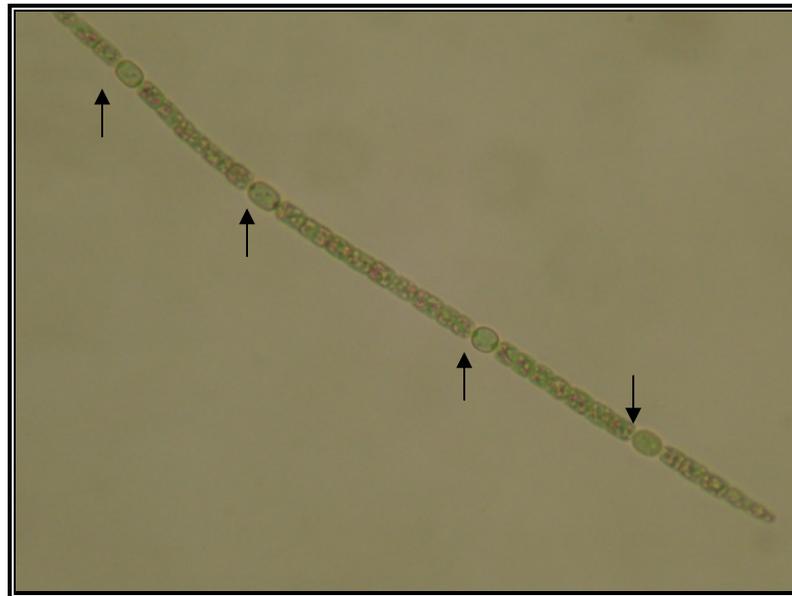


Figura 1.2 *Anabaena* sp. con heterocistos ubicados intercaladamente 40x.

Otra célula diferenciada a partir de las células vegetativas son los acinetos. Los acinetos son células en descanso que se desarrollan de células individuales o después de la fusión de dos o más células vecinas. Generalmente surgen cerca del final del periodo del crecimiento vegetativo, aunque su producción no es obligatoria. Su morfología, tamaño, posición dentro del tricoma, características de la pared celular y modo de germinación aparentemente están determinados genéticamente y han sido utilizados como caracteres críticos para distinguir el género y especie. En algunas especies dentro del género *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Anabaenopsis* los acinetos se desarrollan en una

configuración definida de hasta cinco en una hilera. Los acinetos pueden aparecer unidos directamente al heterocisto o pueden estar distantes a él, separados ya sea por una o muchas células vegetativas. Cuando maduran pueden ser más largas que las células vegetativas (Wehr y Sheath, 2003). Los acinetos en la *Anabaena cilíndrica* se presentan con frecuencia junto a los heterocistos y en la *Anabaena CA* se presentan en intervalos entre heterocistos, sin embargo hay ciertas excepciones en las que los acinetos se desarrollan en ausencia de heterocistos. Según Carr y Whitton (1982) la presencia de heterocistos no es esencial para la formación de acinetos, sin embargo ellos imponen el arreglo espacial de los acinetos a lo largo del filamento (Figura 1.3).

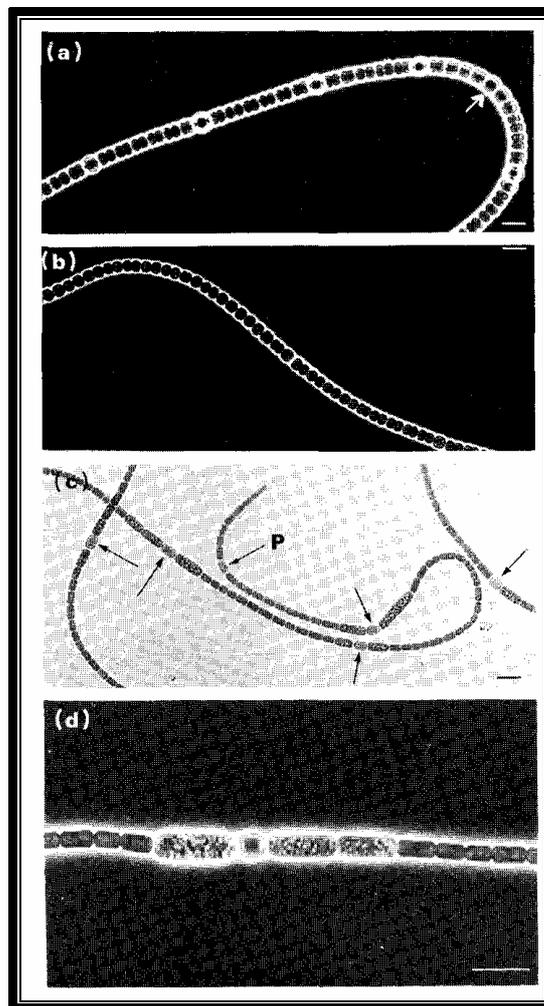


Figura 1.3 Acinetos en *Anabaena* sp. (a) *Anabaena CA* en ausencia de nitrógeno con heterocistos esparcidos a intervalos a lo largo del filamento y un proheterocisto (flecha). (b) *Anabaena CA* en presencia de nitrato ($17\mu\text{M}$) muestra una inhibición en el desarrollo de heterocistos. (c) *A. cilíndrica* en ausencia de nitrógeno. Un único proheterocisto (p) y muchos heterocistos (flechas), también se observa acinetos en uno y a

ambos lados de los heterocistos. (d) Parte de un filamento de *A cilíndrica* con un heterocisto con acinetos en ambos lados. Todos en campo de contraste, excepto la c, la cual se encuentra en campo claro (Carr y Whitton, 1982).

Este género de cianobacteria se caracteriza por su capacidad de fijación de nitrógeno, hecho que le ha dado mucha importancia en el sector industrial arrocero donde se lo asocia a la *Azolla* para así aumentar la producción al introducir nitrógeno al suelo por medio de los heterocistos (Montaño, 2005).

Generalmente se los encuentra formando blooms en agua dulce, varias especies suelen ser encontradas en el suelo y otras en agua salada.

Muchas veces estos blooms pueden ser tóxicos ya que ciertas especies de *Anabaena* como la *Anabaena flos-aquae* produce anatoxinas, veneno neuromuscular convirtiéndose así en un peligro para animales de granja (Brett et al., 1999). Venkatamaran (1986), describe a la *Anabaena* sp. como biofertilizante, también Morales et al. (2002) la describe como fuente de pigmentos y exopolisacáridos. Sin embargo la mayoría de estudios que se han realizado sobre la *Anabaena* van más vinculados hacia la biología molecular de los ficobilisomas, purificación de ARN polimerasa y la diferenciación de heterocistos (Buikema y Haselkorn, 1991) además de la inducción de proteínas (Giraldez et al., 1997).

La *Anabaena* sp. es una de las bacterias mayormente utilizadas para la investigación por la facilidad de extracción de sus pigmentos y exopolisacáridos, y la elevada estabilidad de su biomasa (Loreto y Morales, 2003a).

Dentro de la composición bruta de la *Anabaena* sp. se encuentran la clorofila a, proteínas y exopolisacáridos. La clorofila a es un pigmento fotosintético primario y su acumulación parece estar íntimamente coordinada con la actividad fotosintética y el desarrollo de los tilacoides. El contenido proteico de las microalgas depende de la fuente de nitrógeno suministrado y se estima que el porcentaje encontrado en peso seco de *Anabaena cilíndrica* oscila entre 43% y 56% (Abalde et al., 1995). Los exopolisacáridos también son sintetizados por la *Anabaena* sp. sin embargo una acumulación de exopolisacáridos ayuda a la formación de biofilms, los cuales son comunidades complejas

de microorganismos recubiertas de polímeros extracelulares que ayuda retener el alimento pero su acumulación puede ocasionar problemas en tuberías y favorece la corrosión de superficies metálicas (Piera, 2003).

A continuación algunas especies de *Anabaena* (Komárek et al., 2006):

ESPECIE	AUTOR
<i>Anabaena catenula</i>	Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena circinalis</i>	Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena felisii</i>	Rabenhorst ex Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Brébisson ex Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena inaequalis</i>	Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena laxa</i>	A. Braun ex Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena oscillarioides</i>	Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena sphaerica</i>	Bory ex Bornet et Flahault, 1888.
<i>Anabaena torulosa</i>	Lagerheim ex Bornet et Flahault, 1888.

Taxonomía de acuerdo al Manual de Bergey (Boone y Castenholz, 2001):

Phylum: Cianobacteria

Class I: Cianobacteria

Subsection IV: From genus I: *Anabaena*

1.4.3.1 Factores que favorecen el desarrollo de la *Anabaena* sp.

Temperatura

Cedillo et al. (1994) sostiene que las temperaturas óptimas de cultivos de microalgas marinas generalmente van desde 15°C a 22°C. Otros rangos de temperatura encontrados como óptimos son 28±2°C en función del pH y CO₂ (Morales et al., 2002) y 30±2°C en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia (Loreto et al, 2003b).

Para cada tipo de *Anabaena* se debe considerar la temperatura a la que está desarrollándose en su medio natural.

Intensidad de luz

La luz es indispensable para el crecimiento de las cianobacterias ya que necesitan de esta para su crecimiento, sin embargo según Mun et al. (1978) el requerimiento de intensidad de luz es más bajo que el de las algas. En efecto Loreto et al. (2003b) obtuvo mayor densidad celular a una irradiancia de $78\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sin embargo los valores más elevados de pigmentos y proteínas se obtuvieron a $156\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Fotoperiodo

La productividad de las cianobacterias fluctúa con las variaciones de luz, es decir requieren de períodos de luz y oscuridad, por lo cual, muchos aspectos de la fisiología microalgal requieren de esta periodicidad (Sournia, 1974). Algunos aspectos fisiológicos que requieren periodicidad son:

- División celular: La división celular ocurre en momentos determinados del día o la noche, hecho por el cual necesitan de la sincronización de la luz.
- Capacidad fotosintética: Se observa con frecuencia una mayor tasa de fotosíntesis en la mañana.
- Absorción de nutrientes: Se ha observado en el día mayor tasa de absorción de nitrógeno y fósforo.

En estudios con la microalga *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* se obtuvieron mayores tasas de crecimiento en el régimen de luz – oscuridad (Toro, 1989).

Rango de pH

La mayoría de cianobacterias requieren un pH entre 7-10. Morales et al. (2002) encontró que a pH 8.0-9.0 hay mayor crecimiento en cultivos de *Anabaena*.

Agitación

La aireación es necesaria para el crecimiento de la *Anabaena* y, esta, a la vez, sirve como agitación.

El medio en el que se encuentren reproduciéndose las cianobacterias no es homogéneo por lo cual las bacterias no recibirán la misma concentración de nutrientes para su crecimiento, este factor hace necesaria la utilización de agitación para optimizarlo. El método más efectivo para la agitación es la aireación dado que el aire a la vez que agita suministra el CO₂ y O₂ que requieren las bacterias para la fotosíntesis. Efectivamente, trabajos con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* demostraron un aumento en la tasa de crecimiento y densidad celular final con el suministro de aire con CO₂ (Fábregas et al., 1994).

Salinidad

En algunos microorganismos como la *Dunaliella salina* se encontró un aumento en el contenido de carotenos a altas concentraciones de sal (Brown, et al, 1989 en Prescott et al., 2004) lo cual indica que ésta tiene efectos sobre la producción de microalgas.

Con respecto al crecimiento, la *Anabaena* sp. tolera salinidades de hasta 15g/L, sin embargo a 20g/L se inhibe su crecimiento (Moisander et al., 2002).

1.4.4 El cultivo de camarones, aspectos generales

Según Bucheli (2000), la cría de camarón se inició en el Ecuador en forma industrializada en 1968 y se expandió de forma vertiginosa a finales de los 70. Uno de los principales puntos que favoreció su expansión fue el manejo a la par de la tecnología de punta, como laboratorios de larvas seleccionadas (larvas sin enfermedades y de antecesores genéticamente seleccionados).

1.4.4.1 Cultivo de camarones

El ciclo de producción se inicia con la selección de larvas de camarón en un laboratorio y posteriormente se los siembra en precriadero ó en piscinas de engorde (estas dos últimas fases se las realiza en granjas camaroneras, incluso un número elevado de granjas siembran las larvas obtenidas del laboratorio directamente a las piscinas de engorde cuya densidad de siembra va de 80.000 a 200.000 animales por hectárea).

La especie de camarón mayormente seleccionada para la producción es el *Litopenaeus vannamei*, el cual se caracteriza por ser carnívoro – omnívoro sin embargo según Bonilla, 2002 el 70% de la alimentación de este crustáceo es fitoplancton y el 30% depende del balanceado.

Los ciclos de producción duran de 120 a 150 días y la producción puede variar de 360 a 1200kg/ha por ciclo y este, a su vez, se puede realizar entre 2.4 y 3.1 por año.

Para una piscina de 10 hectáreas con camarones de promedio 7 gramos (50 días de edad) con densidad de siembra de 100.000 por hectárea se requiere aproximadamente 428Kg de balanceado diario (Bucheli, 2000).

Según Sonnenholzner (2005), uno de los mayores gastos en la producción intensiva de camarón lo constituye el alimento balanceado y lo podemos confirmar con la extrema cantidad de balanceado requerida para 10 hectáreas de cultivo normal.

1.4.4.2 Situación actual del camarón ecuatoriano

La industria camaronera actualmente genera un promedio de 125.000 toneladas anuales, ubicándose así, como el primer productor de camarón a nivel de América Latina, sin embargo China, con un millón de toneladas al año, es quien maneja los precios internacionales, lo que ha provocado que estos bajen precipitadamente alrededor de un 40% desde 1999 (Diario Correo, 2007).

En los últimos tres meses una serie de eventos convenientes como la eliminación del arancel que Estados Unidos impuso al camarón ecuatoriano y su disminución de compra al camarón Chino, han provocado un aumento en el precio del camarón de \$1.90 el kilo a inicios de Octubre del 2007 a \$2.10 el kilo a mediados de Octubre del 2007. Sin embargo las previsiones mundiales advierten que Asia seguirá dominando la industria en los próximos años (La Gran Época, 2007).

Por la competencia que existe actualmente en el mercado del camarón, se espera una mayor integración de las empresas que manejan toda la cadena productiva del camarón, también se espera un aumento de empresas fabricantes de balanceado para bajar

costos de producción y un avance en la tecnología para seguir en la búsqueda de opciones biotecnológicas para mejorar la producción a bajos costos en la industria camaronera del Ecuador.

1.4.5 Uso de microalgas en la alimentación de camarones

Dentro de la nutrición animal se han desarrollado numerosas aplicaciones de cianobacterias y microalgas en distintos campos tecnológicos; en cultivos masivos o continuo, libres o inmovilizados, vivos o procesados. Actualmente algunas de estas aplicaciones se encuentran en plena explotación comercial, incluso para la nutrición humana (Abalde et al., 1995).

En el área acuícola, las microalgas son un componente esencial en la dieta de larvas de crustáceos, sobre todo en el *Litopenaeus vannamei*, el cual es quizá, una de las especies menos carnívora, por lo que depende más del fitoplancton (Bonilla, 2002). Las microalgas también sirven de alimento para el zooplancton que este a su vez también se complementa como alimento vivo para juveniles de peces y crustáceos. Santacruz (1999), enunció el aislamiento y siembra, en sistemas de cultivo intensivos en granjas camaroneras, de más de 40 especies entre algas verdes, verde-azules (cianobacterias), dinoflagelados y diatomeas. Entre las microalgas más frecuentemente cultivadas y utilizadas en acuicultura como alimento de organismos marinos, son: *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp. *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaedactylum tricornatum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracili* (Le Borgne, 1990 en Santacruz, 1999).

Las microalgas en el sector acuícola no son incluidas como parte de la dieta en los animales de producción pero De Pauw y Persoone (1988) consideran que los suplementos algales incrementan significativamente la supervivencia de las larvas. También Coll (1983) en Cedillo et al. (1994) menciona que las microalgas tienen gran importancia en la acuicultura por su posición en la pirámide alimenticia ya que convierten sales inorgánicas en compuestos orgánicos con ayuda de la luz. En un análisis del efecto de microalgas en la fase de crecimiento estacionaria y exponencial sobre la cría de larvas de camarón *Penaeus vannamei* se obtuvo buenos resultados con dosis elevadas (100.000 y 150.000 cél/mL) de

microalgas en las fases zoea 2 y zoea 3 del crecimiento larval del camarón (Cedillo et al., 1994).

Las microalgas han sido utilizadas satisfactoriamente en la alimentación de estados larvarios de langostinos debido a que estos tienen requerimientos proteicos entre un 30 y un 50% y las microalgas lo abastecen por su contenido proteico entre 30 y 60%. Un ejemplo de cianobacteria utilizada en la acuicultura es la *Spirulina* la cual es cultivada como alimento para especies animales como *Peneidos*, moluscos, Artemias, *Brachionus* (De Pauw y Persoone 1988).

Con respecto a la *Anabaena* sp. no se han publicado aplicaciones de esta microalga en granjas acuícolas, sin embargo se ha observado un mayor crecimiento en camarones *Litopenaeus vannamei* únicamente en piscinas donde se había proliferado *Anabaena* sp. con un promedio de 2.35g de aumento de peso del camarón por semana versus 1.24g en piscinas sin *Anabaena* sp. bajo las mismas condiciones en la camaronera Bellamar ubicada en la parroquia Barbones, cantón El Guabo, provincia de El Oro (Romero, 2006 comunicación personal). En distintos sectores camaroneros Aguilar y Orellana (2006) confirman observaciones similares. A la vez Veriñaz y Tapia (1994) afirman que en el Ecuador ya se ha trabajado con microalgas como alimento vivo para el cultivo de larvas de camarón.

Un problema con respecto a las cianobacterias cuando alcanzan concentraciones elevadas en granjas camaroneras es el “olor a choclo o tierra” que ellas producen (Ortiz, 2003), pero son eliminadas con los recambios de agua o aplicaciones de sulfato de cobre (Boyd y Tucker, 1998). Además, al eliminar el bloom de microalgas 15 días antes de la cosecha del camarón, desaparecería el “olor a choclo” no deseado (Romero, 2006 comunicación personal) pero ya se habría aprovechado por 120 días a las microalgas como alimento al camarón.

El efecto positivo de la adición de microalgas a los tanques sobre el ritmo de crecimiento y supervivencia se ha atribuido al mantenimiento de la calidad del agua por la acción de las microalgas –producción de oxígeno y utilización de amonio- según Bonilla (2002), así como a la excreción de factores de crecimiento según Brown (1989). Las proteínas son utilizadas como fuente de energía metabólica y su requerimiento es elevado

tanto en la fase de postlarva como en la fase juvenil, esto es, mayor al 30% (Rosas, 2003), es decir, que prácticamente en todo el ciclo que cumplen los camarones dentro del periodo de cultivo mantienen elevados requerimientos proteicos.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis general

- La *Anabaena* sp. alcanza un promedio mayor de densidad celular a 10g/L de sal.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Colaboradores

Para la elaboración de la tesis “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Anabaena* sp. DE LA CAMARONERA SAN AGUSTÍN, MACHALA PROVINCIA DE EL ORO, ECUADOR 2007 Y EVALUACIÓN DE SU CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SAL” se contó con el apoyo de la Camaronera BELLAMAR, quienes de alguna manera fueron la inspiración del tema y a la vez cedieron el laboratorio, instrumentos e información para el desarrollo del tema.

También se contó con el apoyo del Ing. Hablich Romero de la Camaronera BELLAMAR

Dentro del personal de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología se contó con la colaboración técnica de la Directora M. Sc Alma Koch y Codirector Mat. Luis C. Castillo C., asignados para dirigir la tesis.

El Laboratorio de bacteriología de la facultad de ciencias Agropecuarias en la Universidad de Cuenca dirigido por la Dra. Mary Encalada, El Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala dirigido por la Dra. Ana Castillo y el Laboratorio de La Carrera Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, colaboraron con el área y equipo para la medición del diámetro bacteriano, el conteo bacteriano y determinación de proteínas, clorofila a y exopolisacáridos de *Anabaena* sp. respectivamente.

El Biólogo Néstor Rosales de la Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela y el Ing. Eduardo Romero de la Camaronera BELLAMAR en la provincia de El Oro, dieron su apoyo como colaboradores externos.

2.2 Zona de estudio

Las muestras se obtuvieron de la Camaronera San Agustín (km 13 de la antigua vía férrea de Santa Rosa), cantón Machala, Provincia de El Oro. Se realizó la parte experimental de la tesis, en el Laboratorio de la camaronera BELLAMAR ubicada en el cantón Machala, Provincia de El Oro.

Se realizó el análisis de los resultados, en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala y en los Laboratorios de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército.

2.3 Período de investigación

La tesis se realizó en un período de 11 meses. Se inició en Febrero del 2007 y finalizó en Enero del 2008.

2.4 Diseño

Para el análisis de densidad celular (cél/ μ L) se aplicó un DCA (Diseño Completamente al Azar) y se analizó con el respectivo ANOVA, complementándose con Scheffé a un nivel de significancia $\alpha=0.05$ entre los cinco tratamientos (0g/L, 5g/L, 10g/L, 15g/L y 20g/L de sal), por cada día transcurrido durante 30 días, que fue el tiempo del crecimiento de la *Anabaena* sp. En la tabla 3.1 se observa los tratamientos utilizados y el número de réplicas.

Tabla 2.1 Tratamientos y número de réplicas utilizados en el crecimiento de *Anabaena* sp.

TRATAMIENTOS	Nº DE RÉPLICAS
T1: 0 g/L de salinidad	3
T2: 5 g/L de salinidad	3
T3: 10 g/L de salinidad	3
T4: 15 g/L de salinidad	3
T5: 20 g/L de salinidad	3

2.5 Metodología

2.5.1 Toma de muestra de *Anabaena* sp.

Las muestras se recolectaron de la Camaronera San Agustín (Kilómetro 13 de la antigua vía férrea de Santa Rosa) en el cantón Machala de la Provincia de El Oro durante un “bloom”, es decir, un crecimiento masivo explosivo de microalgas, donde dominaba *Anabaena* sp.

La piscina de cría de camarón donde se recolectó la muestra presentaba una pequeña coloración verdusca y un fuerte “olor a choclo”, factores que caracterizan a un bloom de *Anabaena* sp. La salinidad del área donde se recolectó la muestra se encontraba a 2.8g/L y el oxígeno disuelto fue de 5.20mg/L.

2.5.2 Constatación de la presencia de *Anabaena* y Cultivo mixto

Para iniciar el cultivo de la *Anabaena*, primero se constató su presencia en la muestra tomada con ayuda del microscopio óptico.

En la muestra extraída se observó un cóctel de microalgas para lo cual se necesitó realizar un cultivo mixto donde se sembró la muestra para hacer más sencilla la identificación de la *Anabaena* sp.

Para cultivar la muestra extraída, se filtró en filtros milliporo de 8µm y se realizaron múltiples lavados con medio estéril. Con ayuda de una micropipeta se tomó 1 mL de la muestra retenida en el filtro y se sembró en medio sólido y medio líquido.³ Proceso sugerido por Rippka (1979).

2.5.3 Aislamiento y caracterización de la *Anabaena*

Para aislar la bacteria se utilizó medio de cultivo BG-11₀ (ver composición en el anexo 2), este medio es específico para cianobacterias (Rippka, 1979), y al eliminar el

³ Únicamente se utilizó medio BG11₀ (Ver anexo 2).

NaNO_3 del medio, se reduce la posibilidad de que cianobacterias no fijadoras de nitrógeno, crezcan en el medio de cultivo. Para facilitar el aislamiento de *Anabaena* sp., se solidificó el medio con agar.

A partir del cultivo mixto, se procedió a aislar la *Anabaena*. Para esto se utilizó un microscopio con lente de aumento 5x donde se identificó la colonia de *Anabaena* sp. en la caja de petri. Con ayuda de un hisopo delgado se tomó parte de la colonia y se sembró en un nuevo medio BG-11₀ sólido. El aislamiento se basó en el método de Broker y Walsby (Rippka, 1979).

Una vez establecida la cianobacteria en el medio de cultivo sólido (puede tardar 5 semanas), se aseguró su purificación volviendo a coleccionar cepas de *Anabaena* sp. y cultivándolas en medio sólido. Se realizaron algunas siembras previo a obtener un cultivo con *Anabaena* sp. como única cianobacteria.

Ya aislada la cianobacteria, se cultivó en medio líquido BG-11₀ en cámara de crecimiento con control de temperatura, luz y aireación (Figura 2.1) hasta alcanzar la fase exponencial con una densidad celular de 1425 cél/ μL . De este cultivo se recolectó 1mL por cada réplica de cada tratamiento.



Figura 2.1 Cámara de crecimiento de *Anabaena* sp. donde se controla la temperatura, luz 12:12h y aireación (1cm=12.20cm).

Las condiciones a las cuales crecieron las bacterias son:

Temperatura: $30,32 \pm 1,37^{\circ}\text{C}$
pH: $7,82 \pm 0,15$
Oxígeno (mañana): $4,05 \pm 0,69\text{mg/L}$
Oxígeno (tarde): $4,25 \pm 0,65\text{mg/L}$

Se tomaron los datos cada tres días. Se monitoreó la temperatura todo el tiempo. La fuente de luz se la obtuvo por focos fluorescentes en un periodo de tiempo de 12:12h y el oxígeno ingresó por un aireador aquafish 500, continuamente durante el crecimiento de la *Anabaena* sp.

La caracterización de la *Anabaena* se basó en una descripción de sus características, esta se comparó con el Manual de Bergey (Boone y Castenholz, 2001). Como soporte a la caracterización de la *Anabaena* se cuantificó: clorofila a, proteínas y exopolisacáridos tomando una muestra del tratamiento considerado óptimo para el crecimiento de *Anabaena* sp..

2.5.4 Cuantificación de la biomasa microalgal

Se realizó la cuantificación de la biomasa microalgal en $\text{cél}/\mu\text{L}$.

En cada tratamiento con su respectiva réplica se realizó tres conteos, lo que dio un total de 45 conteos cada tres días, durante 30 días, que fue el tiempo desde la siembra de *Anabaena* sp. hasta su muerte (Anexo 3).

Para la cuantificación se tomó 1mL por réplica y se centrifugó a 15115.36g durante 15 minutos en microcentrífuga BOECO – GERMANY. Lo precipitado se molió con una varilla de vidrio y se resuspendió con agua destilada con la concentración de sal correspondiente de cada réplica.

La molienda de las células se llevó a cabo con la finalidad de separar las células vegetativas y así facilitar el conteo. En este método se puede correr el riesgo de romper las

células, sin embargo esto no ocurrió porque no se tiñó de azul la muestra, lo cual hubiera significado liberación de ficocianina.

La densidad celular se calcula con la fórmula:

$$\text{Densidad celular} = \frac{\text{promedio de células}}{0,04\text{cm}^2 \times \frac{0.01\text{cm}}{\text{dilución}}} = \text{cél} / \text{cm}^3$$

Superficie recontada 4 cuadrados = $0,04\text{cm}^2$

Profundidad de la cámara = 0.01cm

Con la densidad celular obtenida de la cuantificación microalgal se realizaron las curvas de crecimiento y sus respectivos ajustes con la media de sus réplicas. Para el ajuste de la curva de crecimiento del tratamiento 1, se utilizó una regresión cúbica para el crecimiento desde el día 0 al 18 y una regresión cuadrática para el crecimiento desde el día 18 al 30. Esta selección se la realizó en base al mejor ajuste realizado en el programa SPSS 8.0 (Statistical Package for social science). Dos datos se modificaron de los originales, estos son los correspondientes al día 18 y al día 21. Su modificación se basó en la toma del menor número obtenido en las réplicas para el caso del día 18 y el mayor número obtenido en las réplicas para el caso del día 21, estos datos fueron modificados para mejorar el ajuste de curva.

En el tratamiento 2, para el ajuste de la curva de crecimiento, se utilizó dos regresiones cúbicas, una para el crecimiento desde el día 0 al 18 y otra para el crecimiento del día 18 al 30. Esta selección se la realizó en base al mejor ajuste obtenido en el programa SPSS 8.0. En este caso no fue necesario modificar ninguno de los datos originales.

Se definió, además, la curva de crecimiento con la primera derivada de la ecuación logística y la función tipo Gaussiana.

2.5.5 Obtención y cuantificación de proteínas totales, clorofila a, y exopolisacáridos de *Anabaena* sp. cultivada a 5g/L de sal.

La cuantificación se realizó durante la fase exponencial de crecimiento de *Anabaena* sp. del tratamiento a 5g/L de sal.

Proteínas totales (Anexo 4)

Las proteínas totales se determinaron según el método de Lowry modificado por Herbert (1971).

Se utilizó 2mL de biomasa para centrifugarse, y de esta forma se pudo realizar la curva patrón para determinar la concentración proteica por espectrofotometría a una longitud de onda de 750nm en un espectrofotómetro AQUANOVA. Se utilizó como solución estándar, seroalbúmina bovina.

Clorofila a (Anexo 5)

Se extrajo 1mL del medio al cual se lo centrifugó y extrajo pigmentos para así cuantificar la clorofila a mediante la ecuación propuesta por Marker (1980).

$$\text{Clorofila a}(\mu\text{gmL}^{-1}) = ((\text{Abs}_{665} \times 13.14) / \text{VM}) \times \text{VE}$$

VM: Volumen de muestra del cultivo utilizado

VE: Volumen del extracto medido.

Abs: Absorbancia

Exopolisacáridos (Anexo 6)

Para la extracción de exopolisacáridos se requirió obtener inicialmente el sobrenadante libre de células por centrifugación, al cual se le agregó etanol en proporción 1:1, y se lo dejó reposar durante toda la noche. Al día siguiente se eliminó el sobrenadante

para tomar únicamente el precipitado, el cual se determinó por peso seco (Shah et al., 2000).

2.6 Análisis de datos

Se consideró un Diseño Completamente al Azar (DCA) dado que las células de *Anabaena* son asignadas de manera aleatoria e independiente a un tratamiento, por lo cual se analizó con la técnica de Análisis de variancia (ANOVA) de un factor. Como a este nivel se encontró diferencias significativas, se recurrió a la prueba de Scheffé con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para realizar comparaciones múltiples entre los tratamientos y establecer diferencias. Los cálculos fueron realizados con el programa SPSS 8.0 (Statistical Package for Social Science) para Windows, 1997.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Crecimiento de *Anabaena* sp.

La *Anabaena* sp. creció en los tratamientos 1, 2, 3 y 4, es decir, a concentraciones iguales a 0g/L, 5g/L, 10g/L y 15g/L de sal respectivamente. El tratamiento 5 con 20g/L de sal no presentó crecimiento en ninguna de las 3 réplicas.

En la tabla 3.1 se observa el promedio por réplica de los datos obtenidos, expresados en densidad celular (cél/ μ L). Todos los tratamientos inician en el día "0" con densidad celular igual a 7.1cél/ μ L. Los tratamientos a 0, 5 y 10g/L presentan crecimiento hasta el día 30, a diferencia del tratamiento a 15g/L que llega hasta el día 24. La mayor densidad celular en la mayoría de los tratamientos se observa en el día 18.

Tabla 3.1 Densidad celular obtenida por réplica en cada tratamiento durante el ciclo de vida de la *Anabaena* sp en 30 días de cultivo.

TRATAMIENTO	RÉPLICA	DÍA_0 (cél/μL)	DÍA_3 (cél/μL)	DÍA_6 (cél/μL)	DÍA_9 (cél/μL)	DÍA_12 (cél/μL)	DÍA_15 (cél/μL)	DÍA_18 (cél/μL)	DÍA_21 (cél/μL)	DÍA_24 (cél/μL)	DÍA_27 (cél/μL)	DÍA_30 (cél/μL)
T1	R1	7.1	110.8	766.7	2041.7	3866.7	6687.5	11200.0	3683.3	4608.3	3200.0	650.0
T1	R2	7.1	107.5	1012.5	1225.0	3166.7	3312.5	9733.3	1141.7	1166.7	2116.7	508.3
T1	R3	7.1	181.7	804.2	2308.3	4383.3	3750.0	7300.0	4066.7	9691.7	5700.0	93.3
T2	R1	7.1	60.8	809.2	5225.0	7550.0	1687.5	13533.3	7766.7	11316.7	8150.0	800.0
T2	R2	7.1	150.0	581.7	1883.3	4850.0	1312.5	5225.0	7950.0	5133.3	3583.3	2308.3
T2	R3	7.1	50.8	711.7	1441.7	6700.0	3979.2	5550.0	4233.3	4133.3	1833.3	731.7
T3	R1	7.1	53.3	110.0	104.2	370.8	100.0	1005.0	1773.3	1255.0	791.7	218.3
T3	R2	7.1	5.0	51.7	287.5	612.5	283.3	3008.3	1858.3	1037.5	837.5	348.3
T3	R3	7.1	23.3	225.8	537.5	1029.2	320.8	780.0	1158.3	1525.0	1345.8	188.3
T4	R1	7.1	0.0	16.7	10.0	4.2	7.5	0.8	0.0	3.3	0.0	0.0
T4	R2	7.1	9.2	0.8	24.2	50.0	7.5	5.8	3.3	3.3	0.0	0.0
T4	R3	7.1	0.0	36.7	38.3	65.8	4.2	1.7	3.3	4.2	0.0	0.0

En la tabla 3.2 se observa en todos los días, a excepción del día 24 y 27, valores menores al valor de significancia establecido $\alpha = 0.05$, lo que significa que durante estos días, la densidad celular entre los tratamientos, es significativamente diferente. No se incluyen los valores del día 0 porque todos los tratamientos empezaron con igual densidad celular (cél/ μ L).

Tabla 3.2 Resultados ANOVA de la densidad celular de *Anabaena* sp. entre tratamientos por día

	F	SIGNIFICANCIA
DIA_3	7.77	0.009
DIA_6	53.61	0.000
DIA_9	4.58	0.038
DIA_12	43.27	0.000
DIA_15	10.02	0.004
DIA_18	9.51	0.005
DIA_21	13.67	0.002
DIA_24	3.70	0.062
DIA_27	3.92	0.054
DIA_30	4.19	0.047

El ANOVA dos factores de la tabla 3.3, busca estudiar los 2 efectos: tratamiento y tiempo, de forma individual y su efecto de interacción, donde los valores P (probabilidad) muestran que existirían diferencias significativas ($P < 0.0001$), por lo tanto estos influirían sobre el crecimiento poblacional.

Tabla 3.3 ANOVA con dos factores de la densidad celular de *Anabaena* sp. con tres muestras por grupo.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F _o	PROBABILIDAD	VALOR CRÍTICO PARA F
Tratamiento	304.97	3	101.66	46.73	3.70E-18	2.71
Días	281.07	10	28.11	12.92	1.41E-13	1.94
Interacción	237.44	30	7.91	3.64	1.32E-06	1.59
Dentro del grupo	191.45	88	2.18			
Total	1014.93	131				

Una vez establecido por ANOVA que el crecimiento poblacional de *Anabaena* sp. se ve afectado por el tratamiento y el tiempo, se necesitó establecer en qué tratamientos específicamente se encuentran diferencias significativas en el crecimiento de la bacteria por día. Para determinarlo estadísticamente se hizo uso del método de comparaciones múltiples por Sheffé con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, donde se observa que el tratamiento 1 y 2 muestran diferencia no significativa en todos los días excepto en el día 12 donde si muestran una diferencia significativa siendo el tratamiento 2 el cual posee mayor densidad celular, 6367cél/ μ L en comparación al tratamiento 1 con 3806cél/ μ L. Entre los tratamientos 3 y 4, de igual manera muestran una diferencia no significativa, pero en este caso durante todo el ciclo de crecimiento. De forma contraria ocurre entre los tratamientos 1 y 3; 1 y 4; 2 y 3; 2 y 4 cuya diferencia no significativa, no se encuentra totalmente establecida más que a partir del día 21 hasta el día de la muerte celular. También se utilizó el método LSD (Diferencia mínima significativa) por medio del programa SPSS 8.0 cuyos resultados fueron similares. En los anexos 7, 8 y 9 se puede apreciar las tablas completas de ANOVA, Sheffé y LSD.

Para realizar las gráficas respectivas de cada tratamiento se obtuvo una media de las réplicas como se indica en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Promedios de densidad celular durante el ciclo de vida de la *Anabaena* sp.

	DIA_0 (cél/μL)	DIA_3 (cél/μL)	DIA_6 (cél/μL)	DIA_9 (cél/μL)	DIA_12 (cél/μL)	DIA_15 (cél/μL)	DIA_18 (cél/μL)	DIA_21 (cél/μL)	DIA_24 (cél/μL)	DIA_27 (cél/μL)	DIA_30 (cél/μL)
Tratamiento1	7.1	133.3	861.1	1858.3	3805.6	4583.3	9411.0	2964.0	5155.6	3672.2	417.2
Tratamiento2	7.1	87.2	700.9	2850.0	6366.7	3979.2	8102.8	6650.0	6861.1	4522.2	1280.0
Tratamiento3	7.1	27.2	129.1	309.7	670.8	234.7	1597.8	1596.6	1272.5	991.7	251.6
Tratamiento4	7.1	3.1	18.1	24.2	40.0	6.4	2.8	2.2	3.6	0.0	0.0

3.2 Curva de crecimiento poblacional de *Anabaena* sp.

3.2.1 Tratamiento 1 (0g/L de sal)

Las ecuaciones obtenidas de los ajustes de curva son:

Ecuación cúbica ajustada desde el día 0 al 18:

$$\text{Densidad celular} = 5.682512(t) + 24.558364(t)^2 - 0.157168(t)^3$$

Ecuación cuadrática ajustada desde el día 18 al 30:

$$\text{Densidad celular} = 852.923554(t) - 27.526222(t)^2$$

Por medio de los ajustes de curva cúbica y cuadrática no se estableció los puntos de inicio y finalización de cada fase, pero por medio de la curva obtenida por la media de las réplicas (figura 3.1) se observa que el crecimiento inicia prácticamente en la fase exponencial, es decir, no hay una fase de adaptación clara, aunque se la podría situar entre los días 0 – 3, a partir del cual se inicia la fase exponencial y desciende súbitamente dando paso a la fase de muerte a partir del día 18.

La densidad celular máxima registrada se observa en el día 18 cuyo valor es 7300 cél/μL.

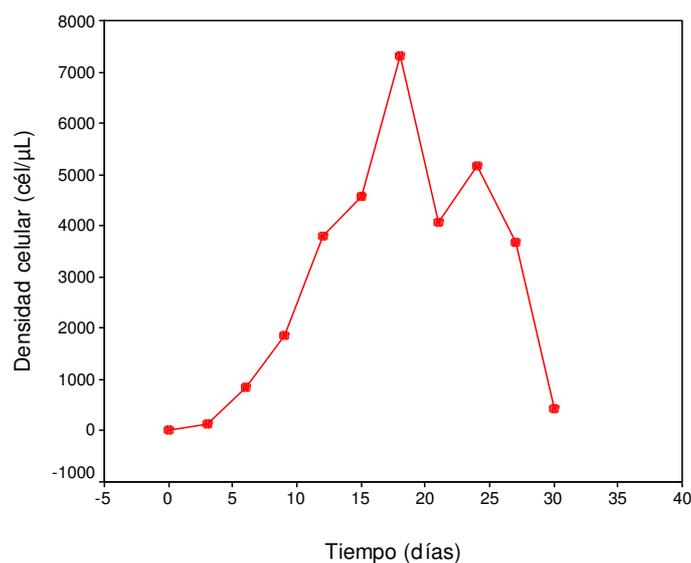


Figura 3.1 Curva de crecimiento promedio de *Anabaena* sp. del tratamiento 1 (0g/L de sal).

El valor de densidad máxima cambia en el ajuste de curva a 6545 cél/ μ L en el día 17 como se indica en la figura 3.2.

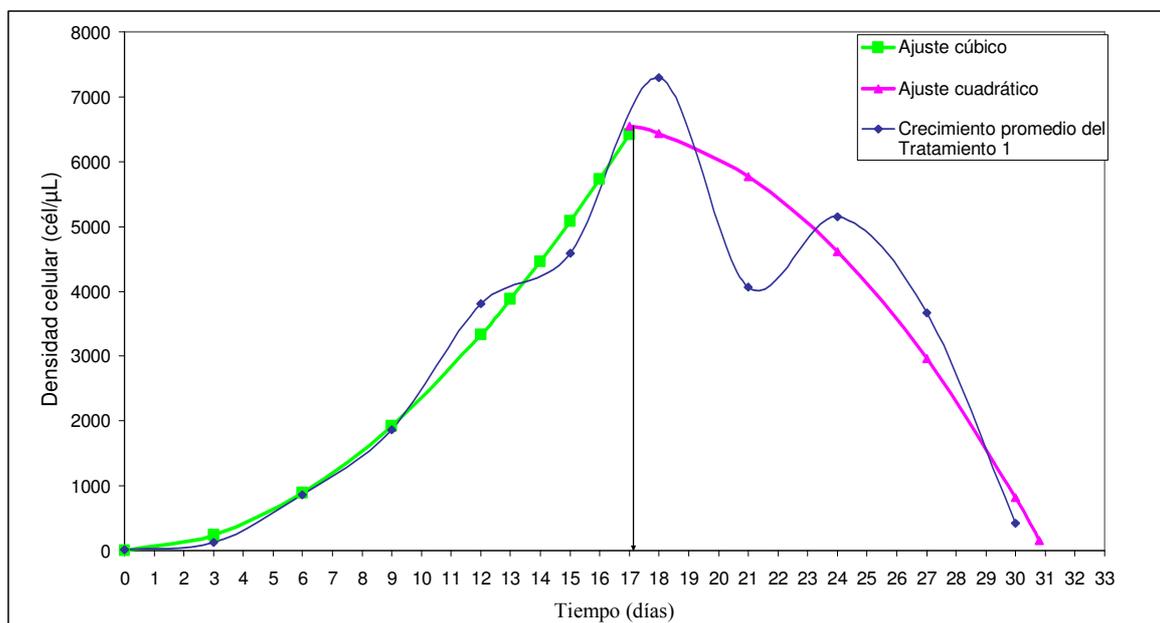


Figura 3.2 Curva de crecimiento de *Anabaena* sp. ajustada por regresión cúbica (verde), cuadrática (rosada) y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 1 (0g/L de sal) azul.

El ajuste de la curva de crecimiento del tratamiento 1 reduce la densidad celular, no presenta puntos de inflexión y dificulta la observación de cada fase de crecimiento, por esta razón se realizó un ajuste utilizando la ecuación tipo Logística, para esto, primero se realizó la curva para el acumulado de la densidad celular observada (figura 3.3).

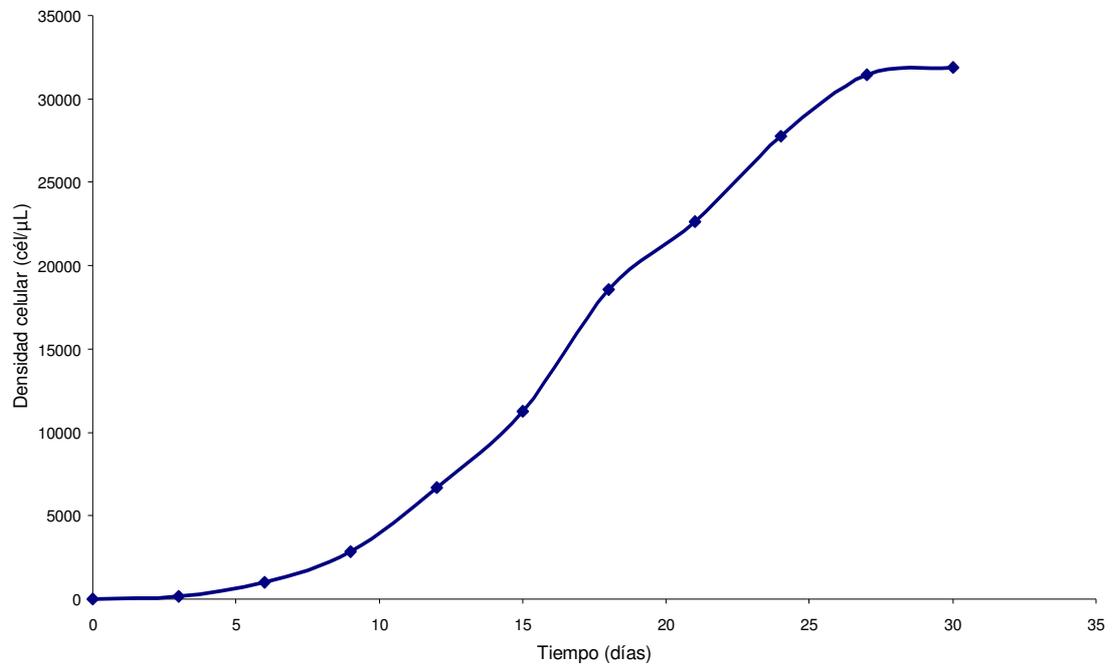


Figura 3.3 Curva del acumulado de la densidad celular del tratamiento 1 (0g/L de sal).

A continuación la ecuación Logística:

$$y = \frac{1}{\frac{1}{u} + ab^t}$$

Posteriormente se utiliza la derivada de la ecuación Logística la cual se ajusta al crecimiento bacteriano desde el día 0 al 30 con un $R^2=0.43$. La densidad celular máxima se observa cerca al día 17 cuyo valor es 7875.74 cél/ μL (Figura 3.4).

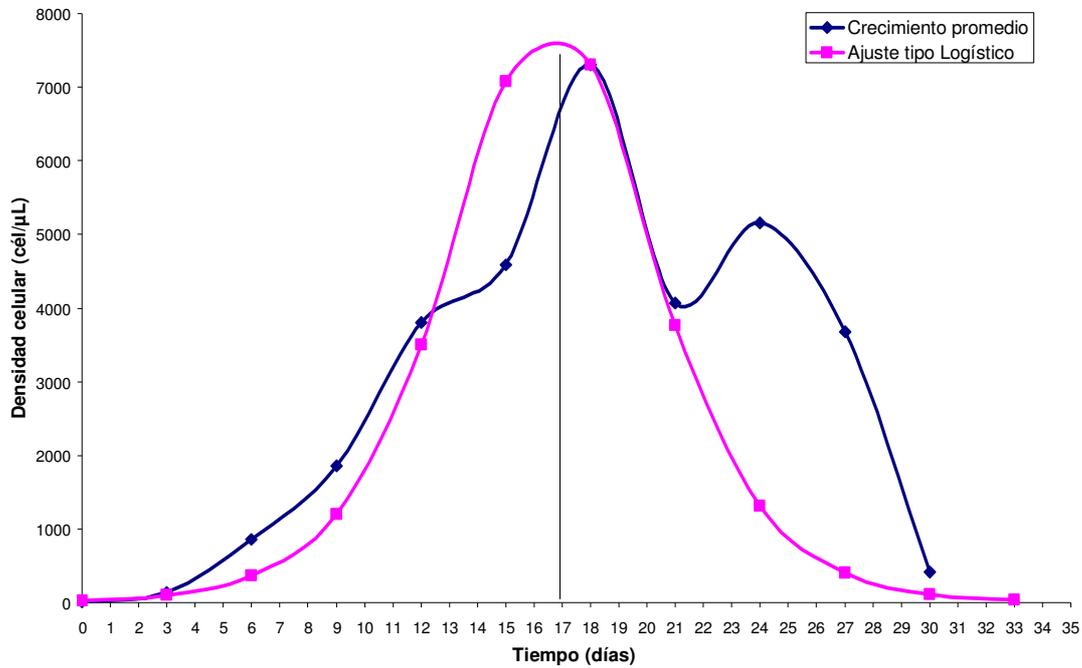


Figura 3.4 Curva de crecimiento de *Anabaena* sp. ajustada con la primera derivada de la ecuación Logística (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 1 (0g/L de sal), azul.

Derivada de la ecuación logística:

$$y' = \frac{-a \ln(b)b^t}{\left(\frac{1}{u} + ab^t\right)^2}$$

a y b = constantes

u = valor más alto del acumulado total

La ecuación final obtenida para el Tratamiento 1:

$$Densidad\ celular = \frac{-0.03 \ln(0.66)0.66^t}{\left[\frac{1}{31900} + (0.66)^t 0.03\right]^2} (2.37) = \frac{0.028(0.66)^t}{[3.13E-05 + (0.66)^t 0.03]^2}$$

El valor 2.37 es un factor de ajuste calculado y utilizado para ajustar la curva obtenida de la derivada de la ecuación Logística a la curva de crecimiento promedio.

A la par se utilizó una función tipo Gaussiana o tipo normal como ajuste de la curva de crecimiento (figura 3.5). En esta curva ajustada se obtuvo un $R^2=0.81$. La densidad celular máxima se observa entre el día 18 y 19 cuyo valor es 7325.78 cél/ μ L.

No se estableció los puntos exactos de inicio y finalización de cada fase, pero se encontró un punto de inflexión⁴ cercano al día 13, el cual indica un leve cambio en la curvatura hacia la fase estacionaria.

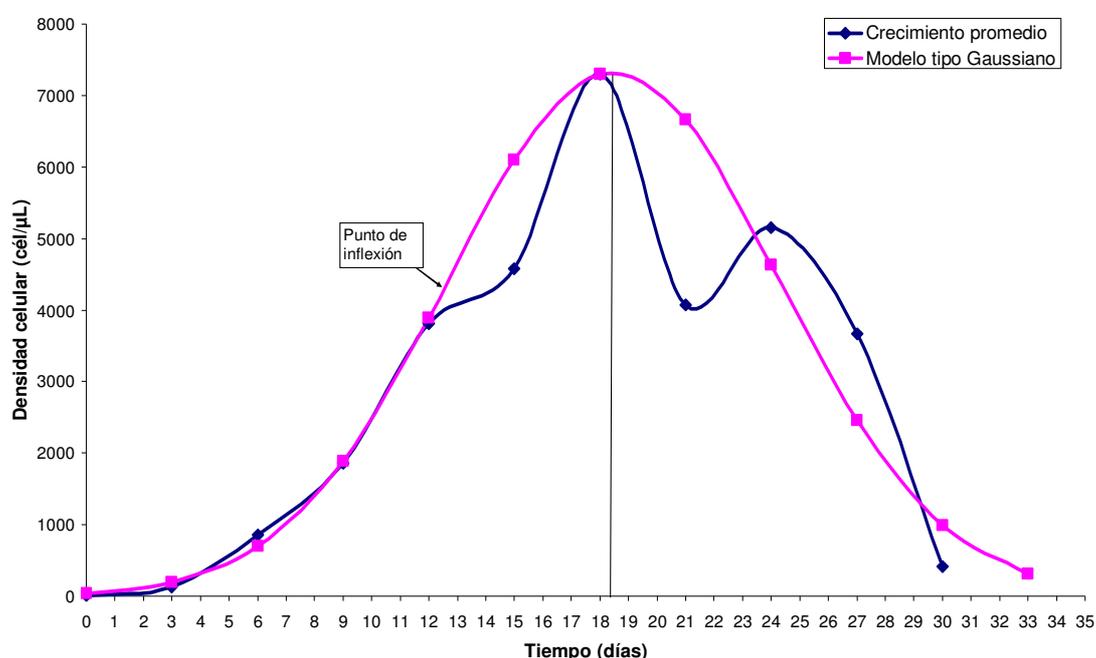


Figura 3.5 Curva de crecimiento de *Anabaena* sp. ajustada con la función tipo Gaussiana o tipo normal (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 1 (0g/L de sal) azul.

La ecuación final del modelo tipo Gaussiano obtenida para el Tratamiento 1:

$$Densidad\ celular = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}5.76} e^{\frac{-(t-18.48)}{2(5.76)^2}} \right) 105785.309 = 7326.78e^{\frac{-(t-18.48)}{66.36}}$$

⁴ Valor en la que la segunda derivada = 0, ó donde la curva cambia de concavidad.

El valor 105785.309 es un factor de ajuste calculado y utilizado para ajustar la curva obtenida de la función tipo Gaussiana a la curva de crecimiento promedio.

3.2.2 Tratamiento 2 (5g/L de sal).

Las ecuaciones obtenidas de los ajustes de curva son:

Ecuación cúbica ajustada desde el día 0 al 18:

$$\text{Densidad celular} = -73.058323(t) + 57.432384(t)^2 - 1.692894(t)^3$$

Ecuación cúbica ajustada desde el día 18 al 30:

$$\text{Densidad celular} = 565.023166(t) + 7.097727(t)^2 - 0.813130(t)^3$$

Al igual que en el tratamiento 1, no se pudo establecer los puntos aproximados en que inicia y finaliza cada fase del crecimiento, sin embargo en este caso con la doble derivada de la primera ecuación cúbica, se pudo establecer un punto de inflexión en el día 11, es decir, que a partir de este día la curva de crecimiento tiene un leve cambio de su fase exponencial a otra fase exponencial en descenso que se acerca a la fase estacionaria. Esta fase culmina en el día 18 para dar paso a la fase de muerte que culmina en el día 30 como se observa en la figura 3.6 y 3.7.

En la figura 3.6, la densidad celular máxima registrada, se observa en el día 18 cuyo valor es 8103 cél/ μ L.

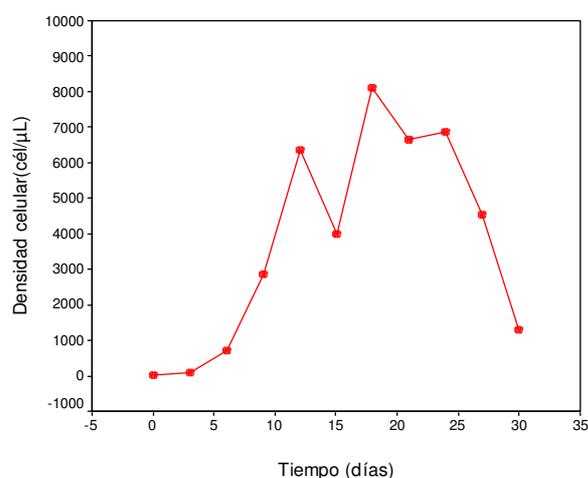


Figura 3.6 Curva de crecimiento promedio de *Anabaena* sp. del tratamiento 2 (5g/L de sal).

El valor de densidad máxima cambia en el ajuste de curva a 7730 $\text{cél}/\mu\text{L}$ en el día 19 (Figura 3.7)

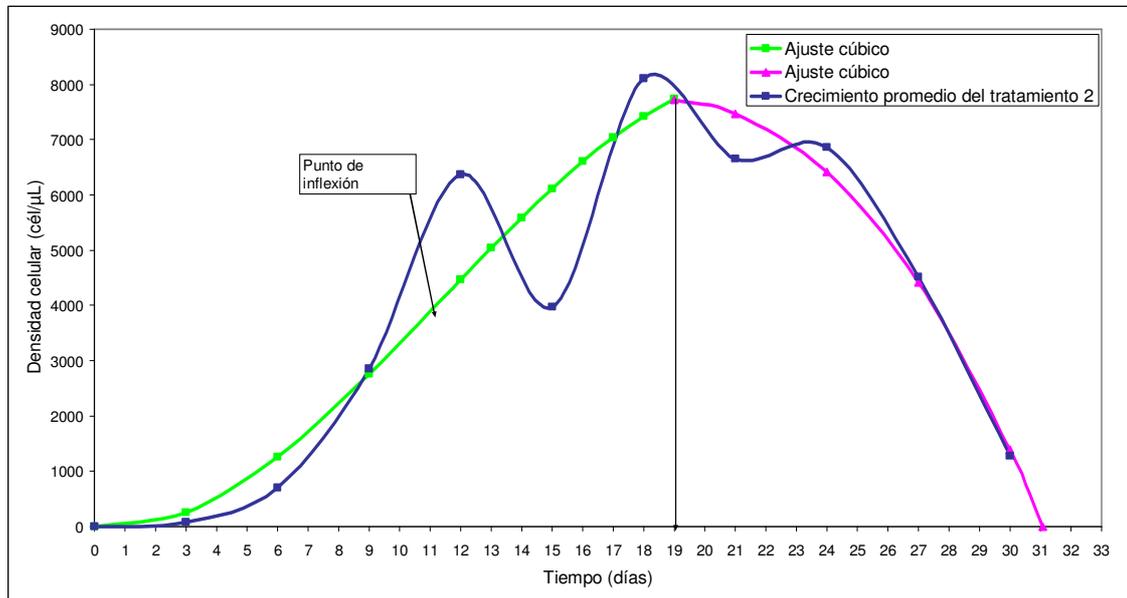


Figura 3.7 Curva de crecimiento de *Anabaena* sp. ajustada por regresión cúbica (verde), cúbica (rosada) y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 2 (5g/L de sal) azul.

El ajuste de la curva de crecimiento del tratamiento 2 reduce la densidad celular, y dificulta la observación de cada fase de crecimiento, por esta razón se realizó un ajuste utilizando la primera derivada de la ecuación Logística, para esto primero se realizó la curva para el acumulado de la densidad celular observada (figura 3.8).

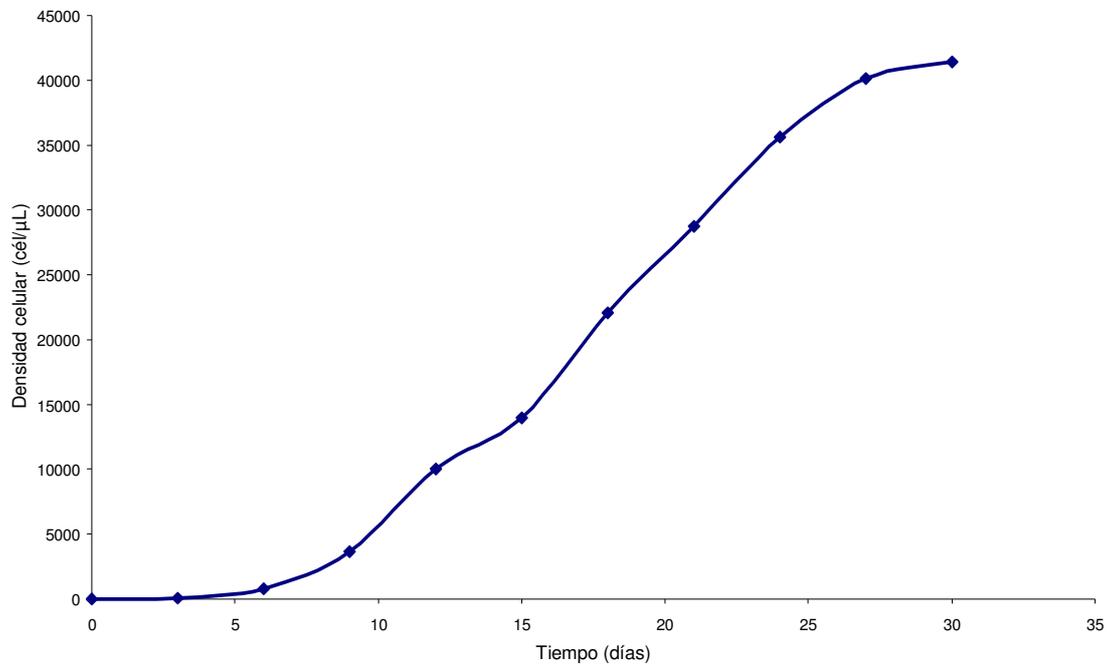


Figura 3.8 Curva del acumulado de la densidad celular del tratamiento 2 (5g/L de sal).

Posteriormente se utiliza la derivada de la ecuación Logística la cual se ajusta al crecimiento bacteriano desde el día 0 al 30 con un $R^2=0.24$. La densidad celular máxima se observa alrededor del día 17 cuyo valor es 8254.68 cél/ μ L (Figura 3.9).

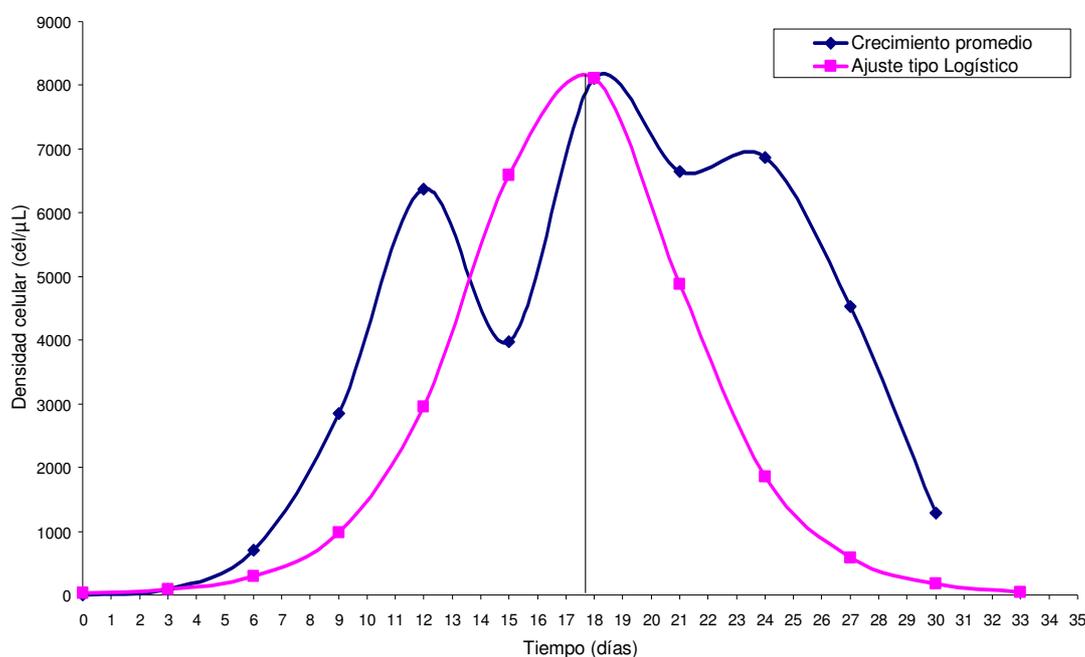


Figura 3.9 Curva de crecimiento de *Anabaena* sp. ajustada con la primera derivada de la ecuación Logística (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 2 (5g/L de sal) azul.

La ecuación final obtenida para el Tratamiento 2:

$$Densidad\ celular = \frac{-0.03 \ln(0.66) 0.66^t}{\left[\frac{1}{41500} + (0.66)^t 0.03 \right]^2} (1.29) = \frac{0.016(0.66)^t}{\left[2.41E-05 + (0.66)^t 0.03 \right]^2}$$

El valor 1.29 es un factor de ajuste calculado y utilizado para ajustar la curva obtenida de la ecuación Logística a la curva de crecimiento promedio.

A la par se utilizó la función tipo Gaussiana o tipo normal como ajuste de la curva de crecimiento como se observa en la figura 3.10. En esta curva ajustada se obtuvo un $R^2=0.81$. La densidad celular máxima se observa alrededor del día 19 cuyo valor es 8169.91 cél/ μ L.

No se estableció los puntos exactos de inicio y finalización de cada fase, pero se encontró un punto de inflexión cercano al día 13, el cual indica un leve cambio en la curvatura hacia la fase estacionaria.

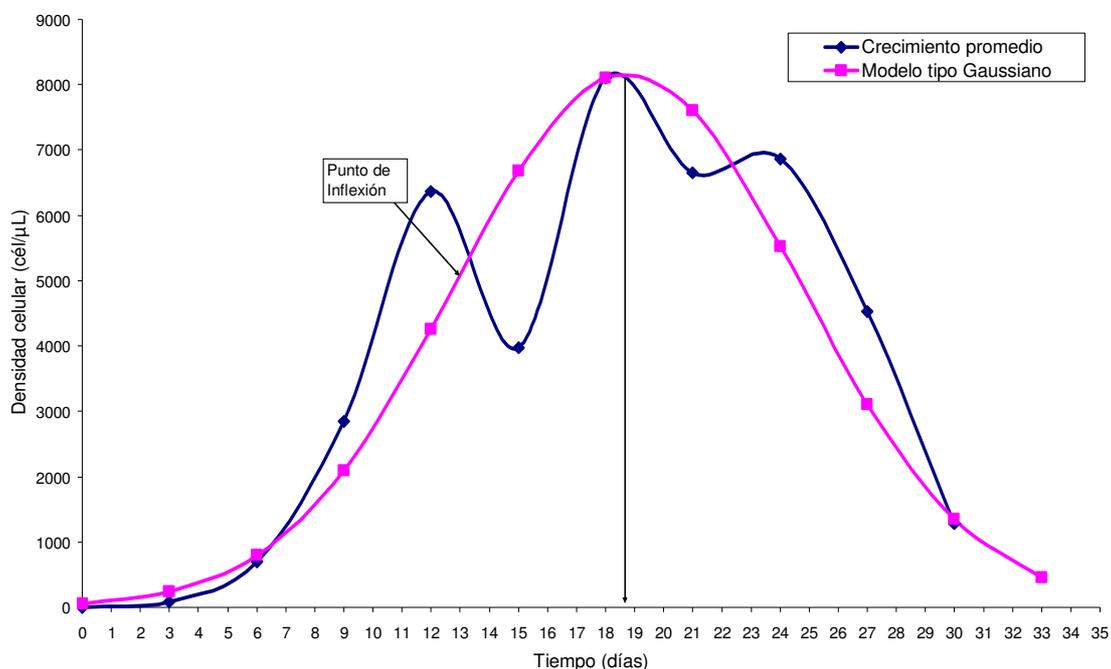


Figura 3.10 Curva de crecimiento de *Anabaena* sp. ajustada con la función tipo Gaussiana o tipo normal (rosada), y curva de crecimiento promedio del Tratamiento 2 (5g/L de sal) azul.

La ecuación final obtenida para el Tratamiento 2:

$$Densidad\ celular = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}5.92} e^{\frac{-(t-18.76)}{2(5.92)^2}} \right) 121278.64 = 8172.83 e^{\frac{-(t-18.76)}{70.09}}$$

El valor 121278.64 es un factor de ajuste calculado y utilizado para ajustar la curva obtenida de la función tipo Gaussiana a la curva de crecimiento media.

3.2.3 Tratamiento 3 (10g/L de sal).

El tratamiento 3 muestra diferencia no significativa con el tratamiento 4 durante todo el ciclo de vida. Al igual que en los tratamientos 1 y 2, en la curva de crecimiento media del tratamiento 3 no se distingue claramente cada una de las fases, prácticamente no

se observa una fase de adaptación, más bien se inicia con un crecimiento exponencial cuyo pico se observa el día 18 con una media de 1598cél/ μ L, a partir del cual no se identifica una fase estacionaria sino de muerte que finaliza en el día 30 como se indica en la figura 3.11.

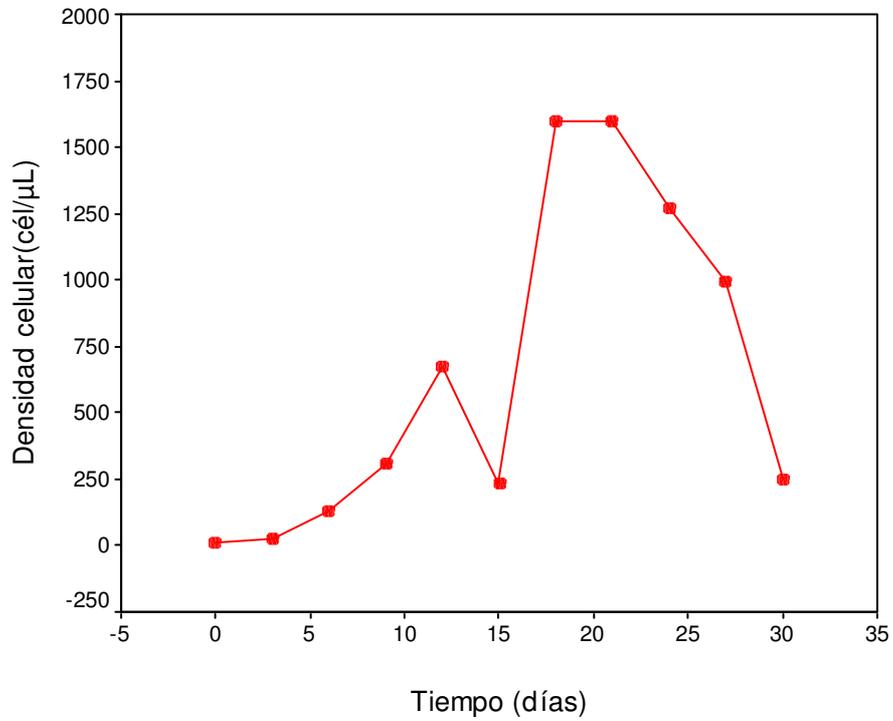


Figura 3.11 Curva de crecimiento promedio de *Anabaena* sp. del tratamiento 3 (10g/L de sal).

3.2.4 Tratamiento 4 (15g/L de sal).

La curva de crecimiento media del tratamiento 4 presenta un periodo de adaptación hasta el día 3 y a partir de este día, inicia su fase exponencial hasta el día 12 con una densidad celular media de 40cél/ μ L. La fase de muerte se inicia inmediatamente después del pico de crecimiento, es decir, del día 12 hasta el día 27, a partir del cual no se encuentra rastro de ninguna célula hasta el día 30 como se indica en la figura 3.12.

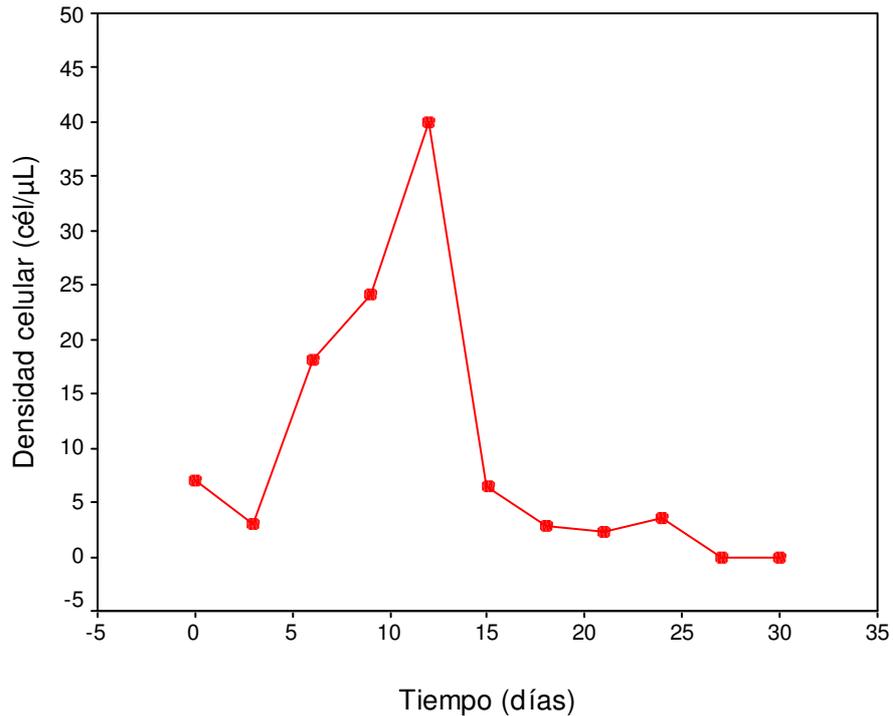


Figura 3.12 Curva de crecimiento promedio de *Anabaena* sp. del tratamiento 4 (15g/L de sal).

3.2.5 Tratamiento 5 (20g/L de sal).

No se presenta el gráfico del tratamiento 5 debido a que no se tabuló ningún dato.

Finalmente en la figura 3.13 se observa que el crecimiento de la *Anabaena* sp. en función de la salinidad sigue el siguiente orden: 5g/L>0g/L>10g/L>15g/L. Aunque estadísticamente los tratamientos 1 y 2, 3 y 4 muestran una diferencia no significativa, entre estos dos grupos si hay diferencia significativa, encontrándose mayor densidad celular a 0g/L y 5g/L de sal y menor densidad celular a 15g/L de sal. También se observa al tratamiento 2 con un pico de densidad celular mayor al tratamiento 1, su curva de crecimiento se diferencia claramente de las curvas de los tratamientos 3 y 4, hecho que se confirma por el método de Sheffé. De igual manera el Tratamiento 1 presenta diferencia significativa de las curvas de crecimiento de los tratamientos 3 y 4, sin embargo observamos una similitud con el tratamiento 2, hecho que se confirma con el método de Sheffé. En la curva de crecimiento del tratamiento 3 se observa una leve diferencia del tratamiento 4, pero por el método de Sheffé se encontró diferencia no significativa.

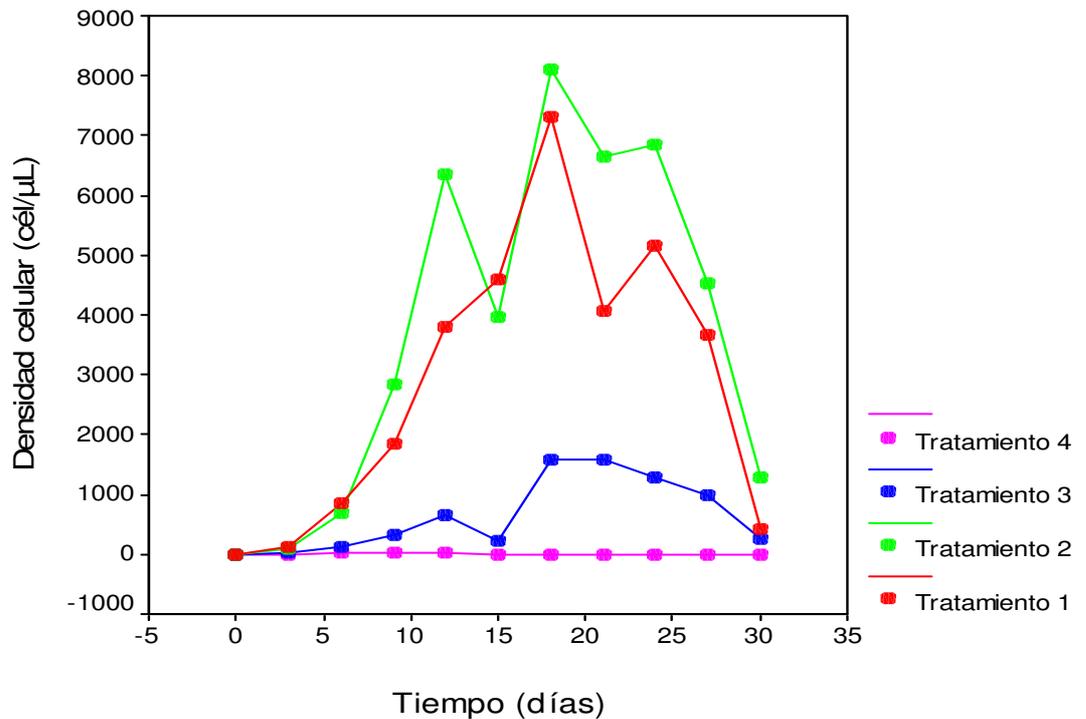


Figura 3.13 Curvas de crecimiento promedio de *Anabaena* sp. de los tratamientos 1 (0g/L de sal), 2 (5g/L de sal), 3 (10g/L de sal), 4 (15g/L de sal) y 5 (20g/L de sal).

3.3 Caracterización de la *Anabaena* sp.

Morfología celular (Figura 3.14)

- Las células vegetativas se encuentran en forma esférica, separadas por constricciones bien diferenciadas en la pared celular.
- Las células terminales tienen forma cónica.
- La coloración celular es verde clara con una ligera coloración azulada.
- El diámetro celular tiene un promedio de $4.64 \pm 0.1 \mu\text{m}$.
- Los heterocistos tienen forma esférica y se encuentran de forma intercalada entre la células vegetativas.
- No hay presencia de acinetos.

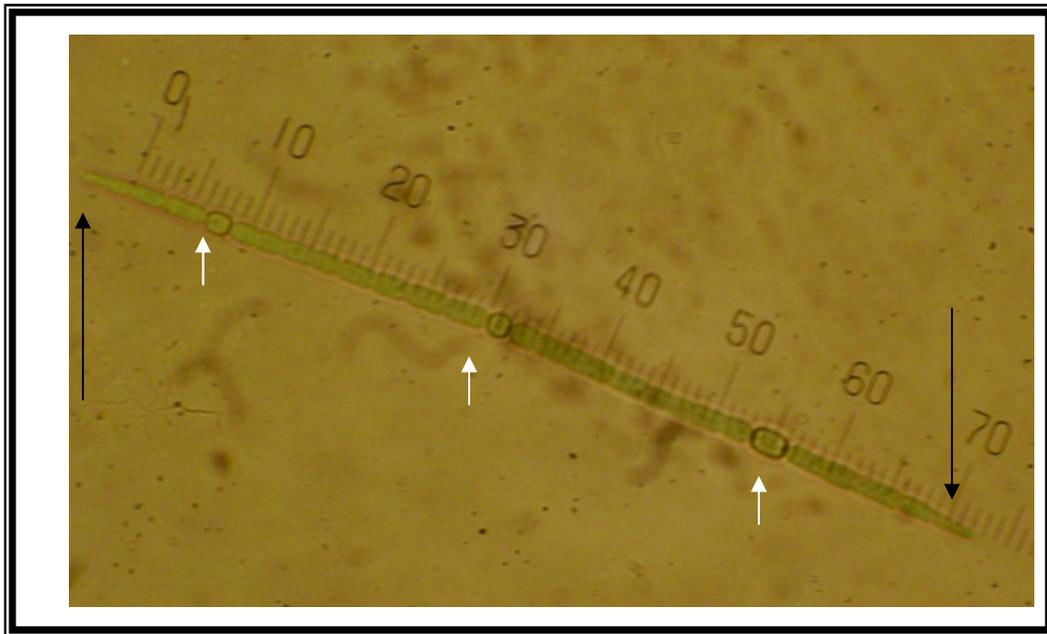


Figura 3.14 Diámetro de células vegetativas de *Anabaena* sp. en lente 40x (10 unidades=25 μm). Las flechas negras indican las células terminales cónicas y las flechas blancas indican los heterocistos intercalados a lo largo del tricoma.

Morfología de colonias (Figura 3.15)

- No se observa una clara formación de colonias
- Algunos tricomas se observan rectos y otros ligeramente sinuosos y sus células terminales tienen forma cónica.
- Los heterocistos se encuentran intercaladamente con un promedio de 20 ± 3.61 células vegetativas entre heterocistos.

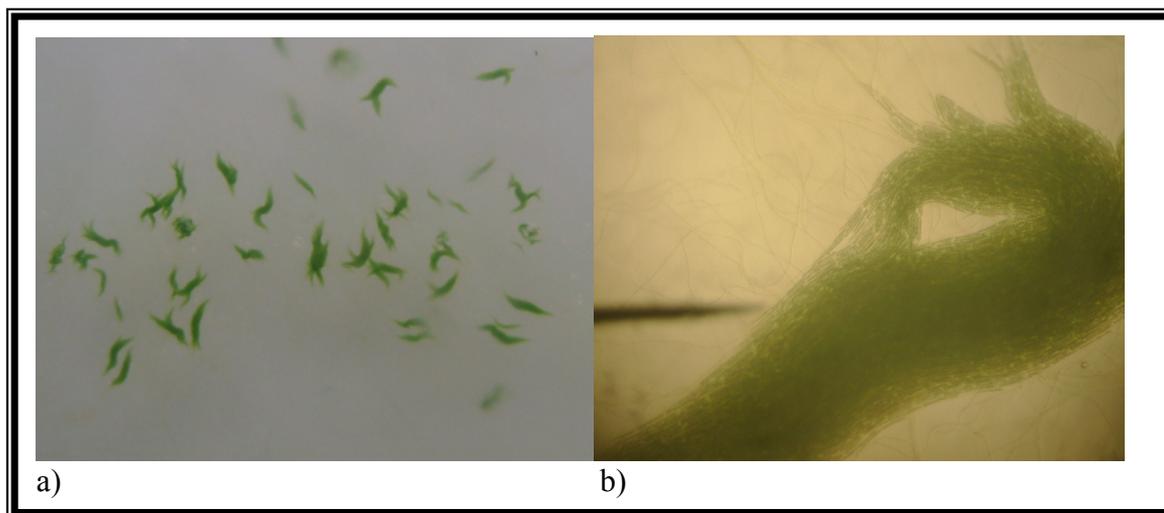


Figura 3.15 Morfología de colonias de *Anabaena* sp. a) Crecimiento de colonias en medio sólido. b) Colonia vista en lente 10x, se aprecian los tricomas rectos y ligeramente sinuosos.

Fisiología / Bioquímica (Figura 3.16)

- Tolera salinidades iguales a 15g/L.
- Presenta inhibición a 20g/L de sal.
- Presenta desarrollo en medio BG-11₀
- No se observó producción de exopolisacáridos durante la fase exponencial de crecimiento.
- Las cantidades por célula de proteínas y clorofila encontradas en *Anabaena* sp. cultivada a 5g/L de sal son: $10.16E-06 \pm (3.85E-06\mu\text{g al } 95\%)$ y $0.51E-06 \pm (0.12E-06\mu\text{g al } 95\%)$ respectivamente⁵.

⁵ Los valores fueron calculados con una densidad celular de 5950 cél/ μL

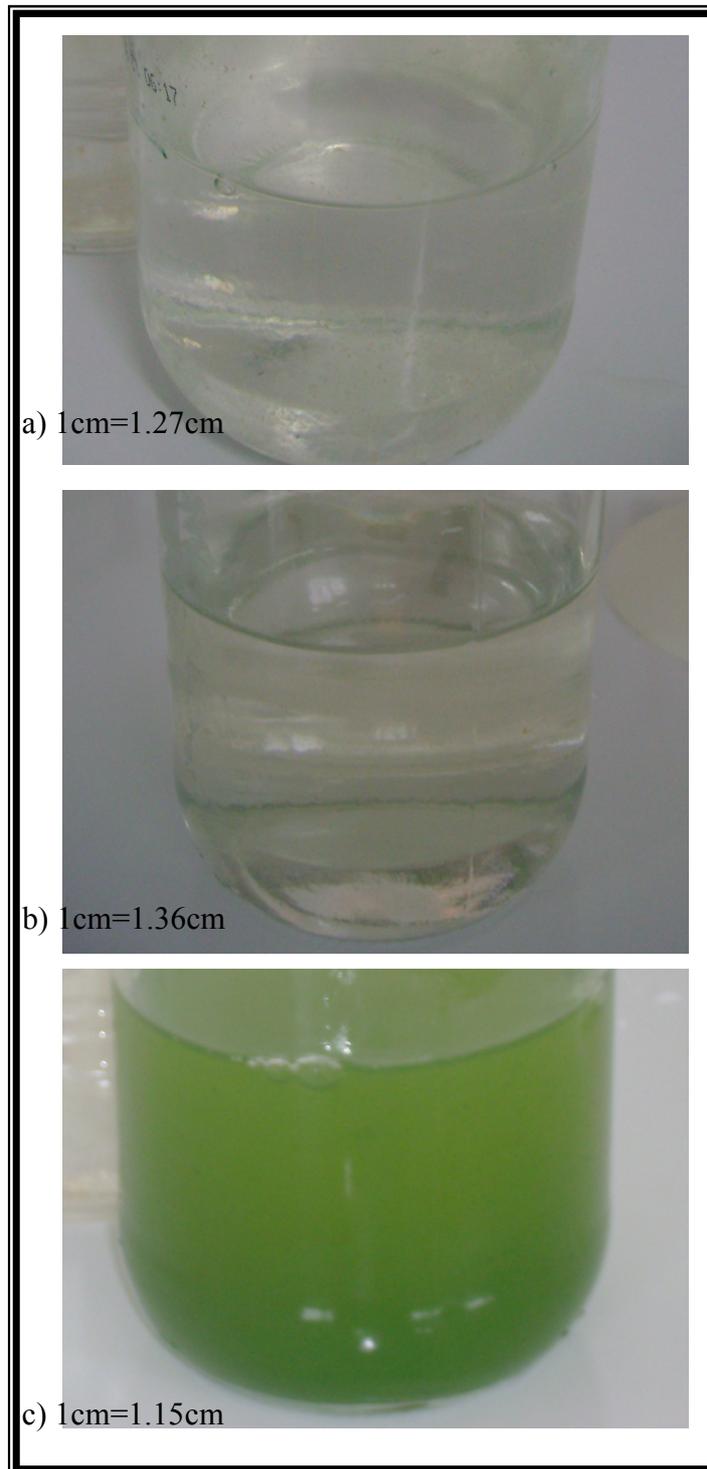


Figura 3.16. Crecimiento de *Anabaena* a distintas concentraciones de sal. a) Inhibición del crecimiento de *Anabaena* a 20g/L de sal (tratamiento 5). b) Supervivencia o tolerancia de *Anabaena* a 15g/L de sal (tratamiento 4). c) Crecimiento óptimo de *Anabaena* entre 0 y 5g/L de sal (tratamiento 1 y 2).

Condiciones de cultivo

- El medio utilizado para el crecimiento de *Anabaena* sp. fue el BG-11₀
- Se utilizó luz artificial con focos fluorescentes en un periodo de tiempo 12:12.
- Se observó crecimiento tanto en medio sólido como medio líquido BG-11₀.
- La temperatura promedio a la cual se mantuvo la bacteria fue de $30,32 \pm 1,37$ °C.
El pH promedio fue de $7,82 \pm 0,15$
- El oxígeno promedio en la mañana y tarde fue de $4,05 \pm 0,69$ mg/L y $4,25 \pm 0,65$ mg/L respectivamente.

Habitat / Ecología

- La bacteria fue tomada de una piscina de cría de camarón, cuyas características fueron: “olor a choclo o monte” y coloración verdusca.
- La altitud a la que se encontró la bacteria fue al nivel del mar.
- La salinidad del área donde se recolectó la muestra se encontraba a 2.8g/L.
- El oxígeno disuelto fue de 5.20mg/L.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento de *Anabaena* sp.

El bajo crecimiento de esta cepa de cianobacteria a 10g/L y 15g/L, la inhibición de su crecimiento a 20g/L, y el buen desarrollo observado a 0g/L y 5g/L de sal, indicaría su preferencia a crecer en agua dulce. Autores como Dexter (2003) mencionan a la *Anabaena* sp. como cianobacteria de agua dulce. Carr y Whitton (1982) las ubica de igual manera en algas de agua dulce pero menciona que se ha encontrado *Anabaena flosaquae* en mar abierto, lo cual podría explicar su tolerancia a salinidades de 15g/L. Moissander et al. (2002) confirma la tolerancia de la *Anabaena* sp. a salinidades de hasta 15g/L y también enuncia que la misma inhibe su crecimiento a 20g/L de sal, hecho que coincide con lo obtenido en el trabajo.

El hecho de que la *Anabaena* sp. muestre un excelente crecimiento en agua no salina y a 5g/L de sal, sugiere una alta eficiencia para colonizar ambientes no salinos y agua marina costera cercana a ríos o que posea salinidades bajas. El sector camaronero se beneficiaría con el crecimiento de *Anabaena* sp. siempre y cuando posea salinidades dentro del rango 0-5g/L, es decir que las granjas acuícolas cercanas a ríos, que posean pozos de agua dulce o, que en época de invierno alcance esta salinidad.

4.2 Curva de crecimiento poblacional de *Anabaena* sp.

En los tratamientos a 0, 5, 10 y 15g/L de sal resulta difícil diferenciar cada fase de crecimiento. No se aprecia una clara fase de adaptación sobre todo en los tratamientos de 0g/L y 5g/L de sal. Aunque se la puede situar entre el día 0 y 3 como se observa en las figuras 3.1 y 3.6. Loreto et al. (2003b) obtuvo un crecimiento exponencial a partir del día 6 con cepas de *Anabaena*, es decir, tardó más en adaptarse. La razón de la falta de una clara fase de adaptación, o más corta en comparación a la aislada por Loreto et al. (2003b) puede deberse a la cepa, la cual fue aislada de un medio con 2.8g/L de sal, o también puede deberse a las condiciones donde fue cultivada, condiciones semejantes al medio de donde fue aislada.

La ecuación con mejor ajuste para los tratamientos a 0 y 5g/L es la tipo Gaussiana, por poseer el mayor $R^2 = 0.81$, además de ajustarse a toda la curva de crecimiento poblacional y presentar puntos de inflexión.

Los tratamientos de 0, 5, 10 y 15g/L inician, a partir del día 18, su fase estacionaria/muerte, excepto el tratamiento 4, que la inicia a partir de el día 12. El tratamiento 4 posee la misma concentración de sal (15g/L) a la cual Moisander et al. (2002) considera como concentración límite, donde se observó crecimiento de *Anabaena* sp. Esta puede ser la razón por lo cual, fue el tratamiento en que menos densidad celular se obtuvo y más pronto alcanzó la fase de muerte.

Se observaron células de *Anabaena* sp. hasta el día 30, donde se distingue claramente la culminación de la fase de muerte. Según Loreto et al. (2003b) el tiempo promedio del ciclo vital de la *Anabaena* PCC 7120 se observa hasta el día 29 – 30, con esto verificamos un comportamiento similar de la *Anabaena* sp. aislada y la *Anabaena* PCC 7120.

4.3 La *Anabaena* sp. como alimento para camarón

El sector camaronero busca aplicar la *Anabaena* sp. ya sea directamente en las piscinas como alimento vivo o como alimento seco junto al balanceado.

Como alimento vivo para camarón, el tratamiento a 5g/L de sal se adaptaría más fácilmente a las condiciones de las piscinas camaroneras. Como alimento seco podría utilizarse el tratamiento a 0g/L de sal ya que al no utilizarse la sal como parte del medio, se reduciría los costos de producción, aunque según Yépez y Morales (1998) en Mora et al. (2002) la concentración de pigmentos en las microalgas aumenta a mayor concentración de sal, incluso trabajos realizados con *Dunaliella viridis* y *Dunaliella salina* se encontró un aumento de proteínas y clorofila, a mayor concentración de sal. Rosales et al. (2004) asegura que un incremento de la salinidad en el medio provoca una mayor producción y acumulación de metabolitos en las cianobacterias. Aunque no se evaluó la producción de proteínas y clorofila a 0g/L de sal, según lo citado anteriormente podría decirse que los valores de proteína $10.16E-06 \pm (3.85E-06\mu\text{g al } 95\%)$ y clorofila $0.51E-06 \pm (0.12E-06\mu\text{g al } 95\%)$ por célula obtenidos del tratamiento a 5g/L serían los más óptimos por ser

producidos a mayor salinidad, y un incremento en la producción de proteínas es un aspecto positivo para el alimento del camarón, razón por la cual el tratamiento a 5g/L de sal, resulta el más apropiado para aplicar, como alimento vivo y seco en granjas camaroneras.

4.4 Caracterización de la *Anabaena* sp.

En cuanto a la morfología, las células aisladas presentaron un diámetro promedio de $4.64 \pm 0.1 \mu\text{m}$, el cual cae dentro del rango (4-5 μm) establecido para *Anabaena*. De igual manera todas las características citadas en resultados coinciden con lo enunciado en Boone y Castenholz (2001).

La *Anabaena* aislada no presenta producción de exopolisacáridos cultivada a 5g/L de sal, lo cual implicaría una reducción en la formación de biofilms, que son comunidades complejas de microorganismos recubiertas de polímeros extracelulares cuya acumulación puede ocasionar problemas en tuberías y favorece la corrosión de superficies metálicas (Piera, 2003). La producción de exopolisacáridos no es una característica fija en la *Anabaena*, muchas lo producen en concentraciones que varían con el medio en que se desarrollen, además, depende de las condiciones bajo las cuales es cultivada.

La producción de proteína de la *Anabaena* sp. por célula cultivada a 5g/L de sal, es de $10.16\text{E-}06 \pm (3.85\text{E-}06\mu\text{g al } 95\%)$, su valor es muy cercano al calculado en un trabajo realizado por Loreto et al. (2003b), cuya concentración de proteína por célula fue de $10.55\text{E-}06\mu\text{g}$.

La producción de clorofila por célula cultivada a 5g/L de sal, es de $0.51\text{E-}06 \pm (0.12\text{E-}06\mu\text{g al } 95\%)$, lo cual significa alrededor de 2.6 veces lo producido por Loreto et al. (2003b). Raven, 1984 en Loreto et al. (2003b), sugiere que la concentración de clorofila es mayor a niveles intermedios de luz ($156 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Sin embargo este valor en el presente trabajo no fue medido, por lo cual se podría deducir que es un aspecto que podría haber influenciado en la producción de clorofila por célula, lo que significaría que la bacteria aislada presentó gran actividad fotosintética.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- 1 La bacteria aislada pertenece al Phylum Cyanobacteria y a la subsección IV del género *Anabaena* sp. según el Manual de Bergey (Boone y Castenholz, 2001).
- 2 La *Anabaena* sp. aislada no posee acinetos, característica que la coloca en el conjunto de células 3 (cluster 3) del Manual de Bergey (Boone y Castenholz, 2001), sin embargo posee características como células terminales de forma cónica que coincide con el cluster 1. Estos datos contradictorios dificultan colocarla dentro de un único grupo, por lo cual no se la clasifica hasta el nivel de especie.
- 3 El ajuste de curva realizado con la ecuación tipo Gaussiana permite establecer una mejor curva de crecimiento poblacional de *Anabaena* sp. por presentar un $R^2=0.81$ y puntos de inflexión que facilitan la observación de las fases de crecimiento.
- 4 La *Anabaena* sp. presenta inhibición de crecimiento a 20g/L de sal, sobrevive a 10 y 15g/L y presenta un mayor desarrollo a 0 y 5g/L, siendo este último el óptimo por presentar la mayor densidad celular en el ajuste de curva por la ecuación tipo Gaussiana, 8169.91 cél/ μ L.
- 5 La mayor densidad celular obtenida de la *Anabaena* sp. aislada en este proyecto, se registra en el tratamiento 2, es decir a una concentración de sal de 5g/L, razón por la cual se rechaza la hipótesis planteada.
- 6 Las curvas de crecimiento poseen una fase estacionaria difusa ubicada entre el día 0 y 3. La fase de muerte se inicia a partir del día 18 – 19 en el tratamiento 1 (0g/L de sal) y 19 en el tratamiento 2 (5g/L de sal).
- 7 La producción de proteína de la *Anabaena* sp. por célula cultivada a 5g/L de sal, es de $10.16E-06 \pm (3.85E-06\mu\text{g al } 95\%)$, y de clorofila por célula es de $0.51E-06\pm(0.12E-06\mu\text{g al } 95\%)$.

- 8 El alto contenido de clorofila a encontrado en la *Anabaena* sp. aislada y reproducida a 5g/L de sal, supone una elevada actividad fotosintética.

- 9 La *Anabaena* sp., objeto de estudio en esta tesis, cultivada a 5g/L de sal, no presenta producción de exopolisacáridos.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

- Es importante a nivel de investigación optar por un aislamiento bacteriano purificado en su totalidad, para así evitar interferencia en los resultados.
- Al momento de contabilizar las bacterias, presionarlas levemente con una varilla de vidrio hasta que se suelten las células.
- Para un estudio posterior de curvas de crecimiento poblacional de *Anabaena* sp. se recomienda el uso de la ecuación de tipo Gaussiana para lograr un óptimo ajuste.
- Se recomienda hacer estudios de crecimiento de *Anabaena* sp. con distintas variables, como el ingreso de oxígeno por aireación, ya que no se ha publicado su influencia en el crecimiento ni en la producción de proteínas, clorofila a y exopolisacáridos.
- La proteína es la base en el alimento del camarón, por lo cual se recomienda el estudio de su producción en *Anabaena* sp. a distintas concentraciones de sal y determinar así su influencia.
- Para aplicación industrial de *Anabaena* sp. se recomienda, aparte de los nutrientes básicos, aplicar nitrato para así aumentar la densidad celular.
- Previo a aplicar la *Anabaena* sp. como alimento para camarón, se recomienda realizar una prueba piloto que optimice su crecimiento para así utilizarla posteriormente como suplemento proteico.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

Abalde J., Cid A., Hidalgo J P., Torres E. y Herrero C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de La Coruña, España.

Aguilar M. (2006). Comunicación personal. Ingeniero acuicultor de la Universidad Técnica de Machala. Biólogo camaronero.

Albarracín I. (2005). *Biotecnología, cultivo y aprovechamiento integral de las microalgas*. Extraído el 23 de enero, 2007. de http://www.secyt.gov.ar/actj/documentos_varios/informe_espindola.doc

Ayala F. y Laing, I. (1990). Commercial mass culture techniques for producing microalgae. In Akatsuka, I., Ed. *Introduction to Applied Phycology*. Academic Publishing. The Netherlands; pp. 447-477.

Boone D. R. y Castenholz R W. (2001). *BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology*, Segunda edición. Volumen 1 *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. "Phylum Bx. Cyanobacteria". Michigan. 473-568.

Bonilla P. (2002). *Dinámica del plancton en estanques camaroneros*. Tesis de Maestría. CENAIM INFORMA. Boletín Informativo Quincenal No. 52. Guayaquil-Ecuador.

Boussiba. S. (1988). *Annabaena azollae* as a nitrogen biofertilizer. In: Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H., Christiasen, D., Eds. In: *Algal Biotechnology. Proceedings of the 4th International Meeting of the SAA*. Elsevier Applied Science, London – New York. pp. 169-171.

Boyd, C.E. y Tucker C.S. (1998). *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Kluwer. Academic Publisher, Amsterdam, Holanda.

Brett N., Dittmann E., Rouhiainen L., Bass A. R., Schaub V., Sivonen K. y Börner T. (1999). Nonribosomal peptide síntesis and toxigenicity of cianobacteria. *Journal of Bacteriology*. 4089-4097

Brown J. (1989). Nutricional aspects of microalgae used in mariculture: a literatura review. CSIRO Marine Reports, N°2005.

Bucheli P. (2000). Consideraciones técnicas para proyectos de acuicultura. Extraído el 2 de septiembre, 2006. de: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/>

Buikema W. y Haselkorn, R. (1991). Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Gene Development* 5:321-330.

Carr N. G. y Whitton B.A. (1982). The biology of cyanobacteria. University of California. Estados Unidos.

Cedillo D., Cabrera W., Berru J. (1994). Análisis del efecto de microalgas en la fase de crecimiento estacionaria y exponencial sobre la cría de larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Grado. Universidad Técnica de Machala. Machala, El Oro.

De Pauw, N. y Persoone G. (1988). Micro-algae for aquaculture. In: Micro-algal Biotechnology. Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp 197-221.

Dexter B. (2003). A field guide to bacteria. Estados Unidos. ISBN:0-8014-3902-7 ó 8854-0

Diario Correo. (2007). Analizan mercados para camarón con valor agregado. Extraído el 22 de noviembre, 2007. de: <http://www.diariocorreo.com.ec/archivo/2007/10/19/analizan-mercados-para-camaron-con-valor-agregado/> Analizan mercados para camarón con valor agregado

Fábregas, J., Herrero, C., Gamillo, Y., Otero, A., Paz, J.M. y Vecino, E. (1994). Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. J. Gen. Appl. Microbiol. 40: 533-540.

FIRI (FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service). (2005). Schwarz, L. Visión General del Sector Acuícola Nacional - Ecuador. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. FAO-Rome. Extraído el 29 de noviembre, 2006. de: <http://www.fao.org/figis/servlet/>

Giraldez, R. N., Mateo P., Bonilla I. y Fernández-Piña F. (1997). 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.

Jaime B. (2004). Empleo del polvo de *Spirulina platensis* en la alimentación de Zoeas y Mysis de *Litopenaeus schmitti*. Extraído el 26 de enero, 2007. de: <http://w3.dsi.uanl.mx/publicaciones/maricultura/vii/pdf/31BarbaritoJ.Ceballos.pdf>

Jiménez R. (1983). Acta Oceanográfica del Pacífico. Vol. 2, No. 2

Komárek., H. (2006). CYANO – DATABASE. Database of cyanoprokaryotes. Ann. Sci. Nat. Bot, ser. 7, 7:224. Extraído el 12 agosto, 2006. de: <http://www.cyanodb.cz/Anabaena/Anabaena.html>

La Gran Época. (2007). El camarón ecuatoriano reemplazaría al chino en el mercado de Estados Unidos. Extraído el 22 de noviembre, 2007. de: <http://www.lagranepoca.com/articles/2007/07/15/928p.html>

Loreto C. y Morales E. (2003a). Productividad de la cianobacteria *Anabaena* pcc 7120 en cultivos semicontinuos. Bol. Centro Invest. Biol., abr., vol.37, no.1, p.21-34. ISSN 0375-538X .

Loreto C., Rosales N., Bermúdez J. y Morales E. (2003b). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* pcc 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. Guyana Bot. vol.60, no.2, p.83-89. ISSN 0717-6643.

Lowry., (1951) and modified by Hebert., (1971). *Methods of Microbiology*. 5B: 209-344.

Maldonado M., Rodríguez J. y De Blas I. (2004). El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. Extraído el 29 de noviembre, 2006. de: http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/21_10.pdf

Marker A. (1980). The use of acetona and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phacophytin. *Freshwater Biology* 2: 361-385.

Massaut L. y Ortiz J. (2002). Aislamiento y cultivo de cianobacterias con potencial toxicidad sobre postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). VOL 9 No.1. Guayaquil, Ecuador.

Moisander P. H., McClinton E. y Paerl H. (2002). Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecology*, 43:432-442

Montaño M. (2005). Estudio de la aplicación de *Azolla Anabaena* como bioabono en el cultivo de arroz en el litoral ecuatoriano. *Revista Tecnológica ESPOL*, Vol. 18, no 1: 147-151

Mora R., Ortiz N., Clemente I., Bermúdez J., Avendaño D y Morales E. (2002). Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila a de microalgas cultivadas y aisladas en la región noroccidental de Venezuela. *Oceánides*. 17(2): 73-83.

Morales E., Rodríguez M., García D., Loreto C y Marco E. (2002). Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *INTERCIENCIA*. vol. 27, no. 7.

Mun, L. R., Gons H. J. y Van Lieke L. (1978). Competition of the green alga *Scenedesmus* and the blue-green alga *Oscillatoria*. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 21, p. 473-479.

- Orellana F. (2006). Comunicación personal. Ingeniero acuícola. Biólogo camaronero.
- Ortiz J.E. (2003). Aislamiento, Identificación, y Cultivo de Cianobacterias con potencial Toxicidad sobre Postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis para obtener el grado de Bióloga, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Piera G. (2003). Estudio del biofilm: Formación y Consecuencias. Extraído el 26 de enero, 2007. de: [http:// magno.uab.es/epsi/alimentaria/biofilm.pdf](http://magno.uab.es/epsi/alimentaria/biofilm.pdf)
- Prescott L., Harley J. y Klein D. (2004). Microbiología Quinta edición. Mc Graw Hill. Madrid. Archaea 505-515.
- Raisman J. (2004). Fotosíntesis, etapas. Extraído el 30 de noviembre, 2006. de: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/fotosint.htm>.
- Rippka R. (1979). Isolation and Purification of Cyanobacteria: Some General Principles. Capítulo 8. 212-219.
- Romero H. (2006). Comunicación personal. Ingeniero acuícola. Biólogo de la Camaronera Bellamar. Cantón Barbones, provincia de El Oro, Ecuador.
- Rosales N., Ortega J., Mora R. y Morales E. (2004). Influencia de la salinidad sobre crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. Departamento de Biología. Facultad experimental de ciencias. Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- Rosas C. (2003). Bioenergética de crustáceos decápodos en camarones *Pendidos*. Centro de Formación de la Cooperación Española en Cartagena de Indias, Colombia.
- Santacruz J. (1999). Criopreservación de microalgas como alternativa para la alimentación de organismos marinos. Tesis de Grado. Machala, El Oro.
- Shah V., Ray A., Garg N. y Madamwar D. (2000). Characterization of the Extracellular Polysaccharide Produced by a Marine Cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142.

Current Microbiology 40: 274-278.

Sonnenholzner S. (2005). Experimentaciones en la Estación Experimental del CENAIM en Palmar. Bol N° 122.

Sournia, A. (1974). Circadian periodicities in natural populations of marine phytoplankton. *Advances in Marine Biology* 12:325-389.

Sowers A., Young S., Browdy C., Grosell M. y Tomasso J. (2006). Hemolymph-ion dynamics in *Litopenaeus vannamei* exposed to dilute seawater and a mixed-ion environment. Department of Biological Sciences. Clemson University. South Carolina.

Staley, J.T. (ed). (1989). *Bergey's manual of systematic bac-* Vol. 3. Williams & Wilkins.

Toro, J.E. (1989). The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two Light regimes. *Aquacult. Fish. Management*. 20:249-254.

Tobey J. (1998). Impactos económicos, sociales y ambientales en el cultivo de camarón de América Latina. Extraído el 11 de diciembre, 2006. de: http://www.crc.uri.edu/download/MAN_0034.PDF.

Venkatamaran, L. (1986). Blue-Green algae as biofertilizer. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture* (ed. A. Richmond). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA. 455-472

Veriñaz W. y Tapia A. (1994). Evaluación de la concentración celular y proteica en *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis chuii*, cultivadas con fertilizantes agrícolas. Tesis de grado. Machala, El Oro.

Wehr J. y Sheath R. (2003). *Fresh water Algae of North America: ecology and classification*. Estados Unidos.

Yépez M. y Morales E. (1998). Efecto de la concentración de nitrato y cloruro de sodio sobre la densidad celular, contenido de pigmentos y proteínas de *Dunaliella viridis*. Bol. Centro de Invest. Biol. 32(1): 1-12

ANEXOS

Anexo 1: Dinámica del crecimiento de algas (Cedillo et al., 1994).

El crecimiento de todo microorganismo es el aumento de sus componentes celulares, que tiene como resultado el aumento de su tamaño, del número de la población o de ambos a la vez.

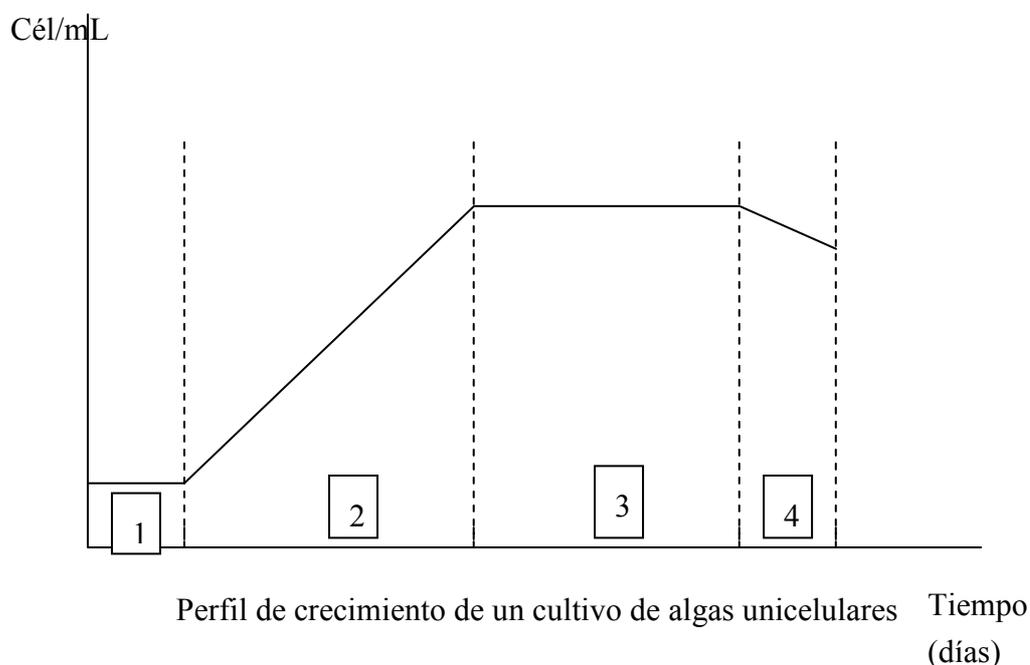
Este crecimiento tiene fases diferentes:

La primera se refiere a la fase de adaptación, es la fase inicial.

La segunda fase se la conoce como exponencial y se caracteriza por una división celular rápida y constante.

Después de la fase exponencial se produce una declinación del crecimiento, esta es la fase estacionaria, la cual puede ocurrir por la disminución de nutrientes, suplemento de CO_2 y O_2 , limitación de luz por el aumento de la biomasa o por la inhibición producida por sustancias tóxicas.

En la última fase, es decir la cuarta, se produce la muerte de las microalgas, la cual es producto de un decaimiento de los nutrientes a un nivel no tolerable para mantener el cultivo por lo que las microalgas mueren por inanición.

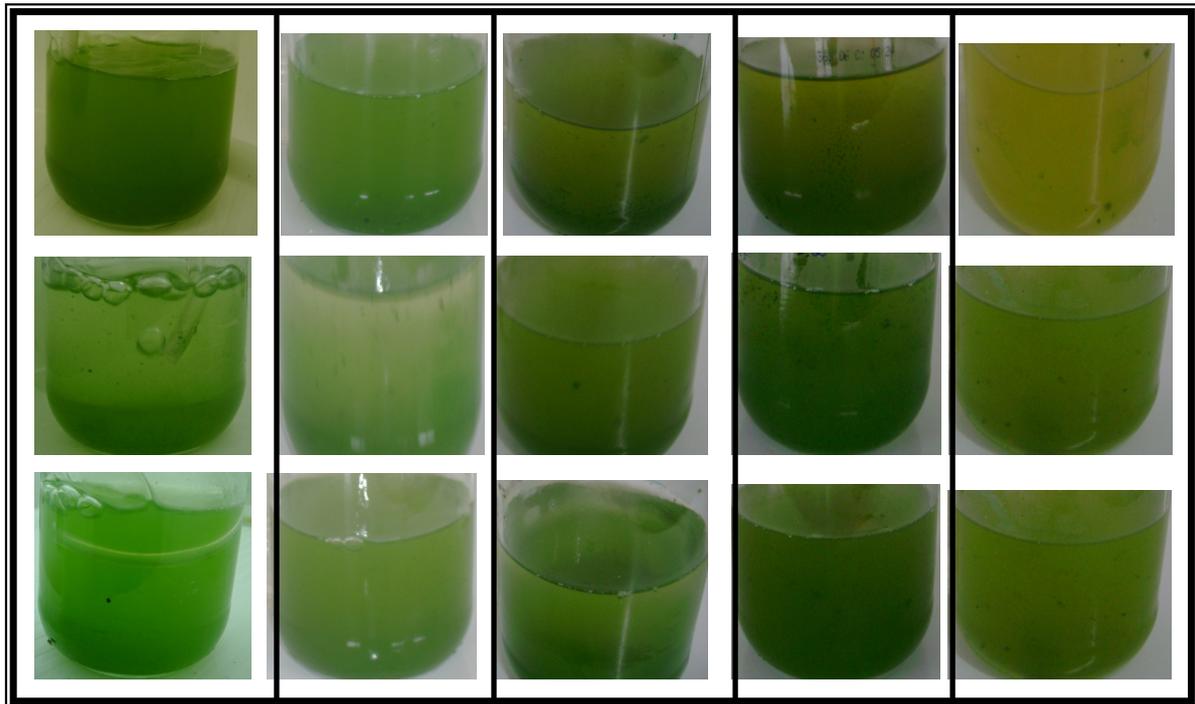


- 1: Fase de adaptación
- 2: Fase exponencial
- 3: Fase estacionaria
- 4: Fase de muerte

Anexo 2: Fórmula de medio BG-11₀ utilizado para el crecimiento de *Anabaena* sp.
(Rippka, 1979)

K ₂ HPO ₄	0.04g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.036g
ácido cítrico	0.006g
Citrato férrico de amonio	0.006g
Na ₂ -EDTA	0.001g
Na ₂ CO ₃	0.02g
Trace element solution	1.0g
Trace element solution (para hacer 1L de solución stock)	
H ₃ BO ₃	2.86g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.494g
Agar – agar	10-15g

Anexo 3: Desarrollo de *Anabaena* sp. a distintas concentraciones de sal.



Día 15

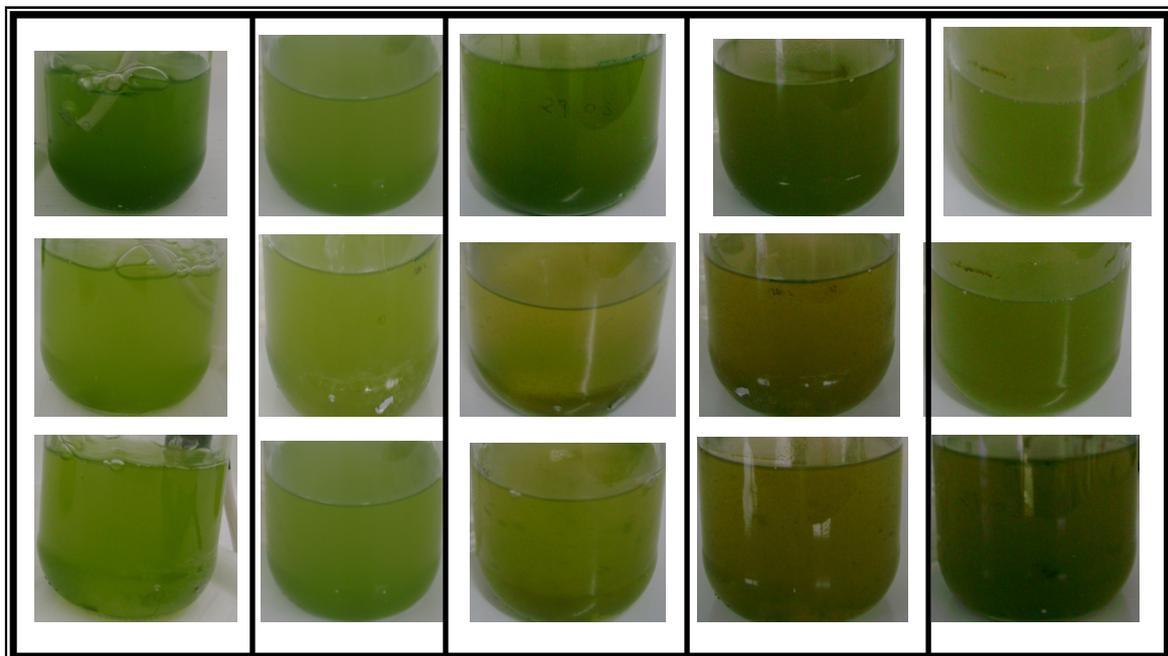
Día 18

Día 21

Día 24

Día 27

Tratamiento 1 (0g/L): Escala promedio 1cm=2.91±0.11cm



Día 15

Día 18

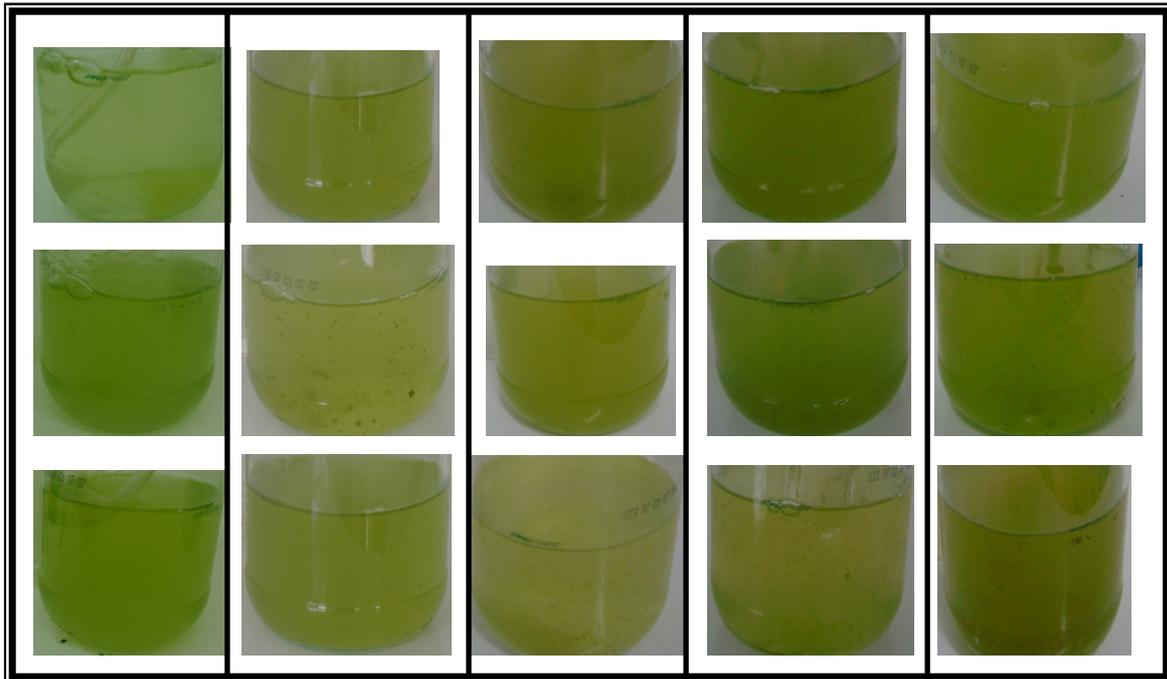
Día 21

Día 24

Día 27

Tratamiento 2⁶ (5g/L): Escala promedio 1cm= 2.97±0.37cm

⁶ En el tratamiento 1 y 2 falta 1 foto, esta fue reemplazada por una réplica del mismo día



Día 15

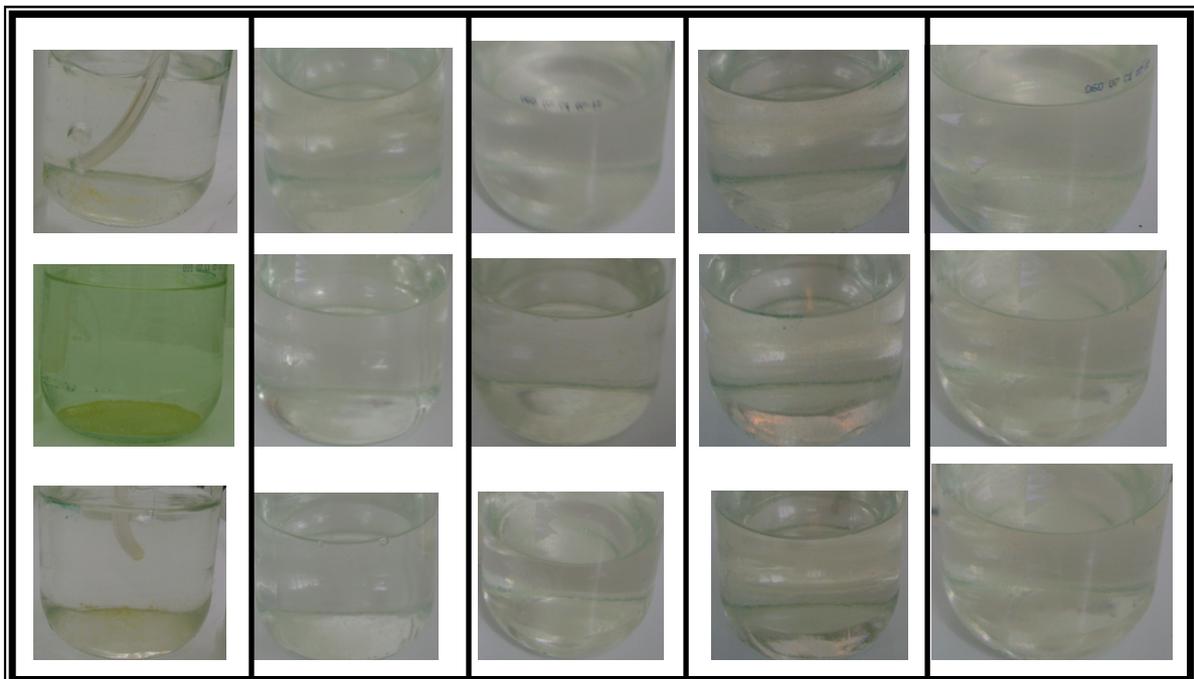
Día 18

Día 21

Día 24

Día 27

Tratamiento 3 (10g/L): Escala promedio $1\text{cm} = 2.81 \pm 0.31\text{cm}$



Día 15

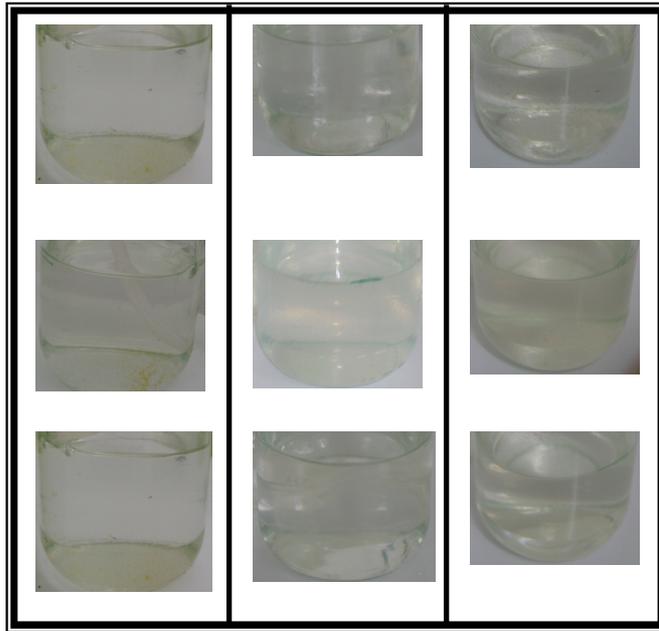
Día 18

Día 21

Día 24

Día 27

Tratamiento 4 (15g/L): Escala promedio $1\text{cm} = 2.91 \pm 0.21\text{cm}$



Día 15

Día 18

Día 21

Tratamiento 5 (20g/L): Escala promedio 1cm=2.98±0.27cm

Anexo 4: Determinación de proteínas en *Anabaena* sp. (Lowry modificado por Hebert, 1971)

Reactivos:

1. Na_2CO_3 al 5% (si es $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ sería al 13.4%, añadir 13.4g).
2. Dilución de Tartrato de sodio-potasio al 1%. En esa dilución de tartrato hacer una dilución de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5% en peso. Esta dilución precipita a las pocas horas, cuando precipite, centrifugar y usar el sobrenadante siempre limpio y claro (el sobrenadante se puede guardar a temperatura ambiente).
3. Mezclar 50mL del reactivo 1 y 2mL del 2.
4. Diluir el reactivo de Folin-Ciocalteu en agua destilada en la proporción 1:1 (este reactivo no se puede guardar).
5. Preparar una disolución de BSA protein Standard 1mg/mL en NaOH. Mantener a 5°C.
6. Preparar NaOH a 1N.

Protocolo:

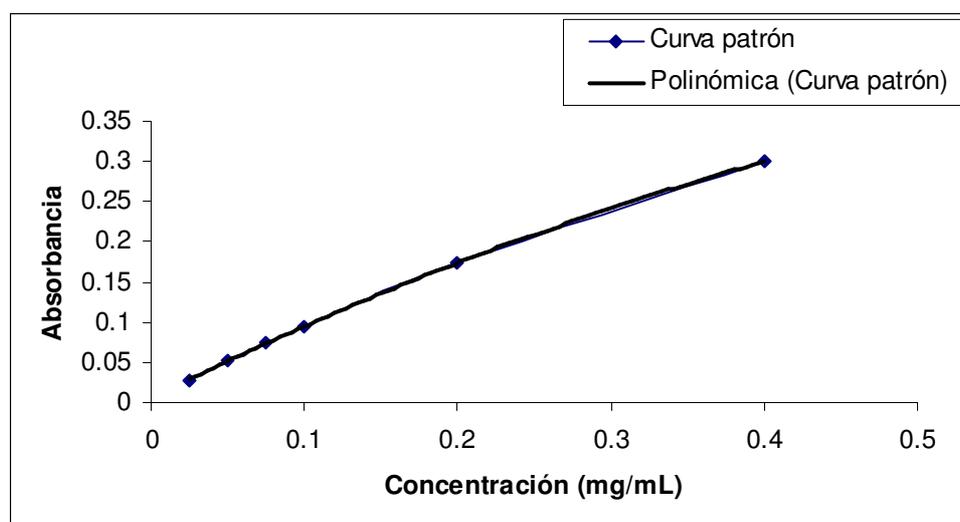
1. Pesar 2mg de muestra. Hay que calcular una cantidad que vaya a caer dentro del rango de la curva dependiendo el tipo de muestra. Añadir 2mL de NaOH 1N.
2. Poner las muestras al baño maría 95-100°C durante 1 hora.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos
4. Centrifugar 10 minutos a 859.52 g
5. Transferir 0.1mL del sobrenadante a un tubo de ensayo (por triplicado) y añadir 0.3mL de agua destilada.
6. Añadir 0.4mL de NaOH 1N y agitar un poco en el vórtex.
7. Añadir 2mL del reactivo 3, tanto a las muestras a analizar como al patrón y al blanco, agitar para homogeneizar.
8. Después de 10min, añadir 0.4mL del reactivo 4 y agitar inmediatamente.
9. Dejar en reposo 30min a temperatura ambiente y leer a 75nm en cubetas de 1cm.

La curva patrón se va a ajustar a la ecuación de una recta de segundo orden:

$$y = ax^2 + bx + c$$

	Blanco	Curva patrón					
μL BSA	0	25	50	75	100	200	400
μL NaOH	500	475	450	425	400	300	100
μL H ₂ O	300	300	300	300	300	300	300

Método propuesto por Lowry, modificado por Hebert (1971).



Curva patrón y ajuste calculados para la determinación de proteínas.

Ecuación: $y = -0.5189x^2 + 0.944x + 0.0054$

$R^2 = 0.9999$

Anexo 5: Determinación de clorofila a en *Anabaena* sp.

1. Tomar 1mL de cultivo fresco y colocar en tubo eppendorff por triplicado por cada réplica de cada tratamiento.
2. Centrifugar a 10×10^3 g durante 10 minutos y descartar el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur de cuello largo.
3. Colocar 1mL de metanol al 95% (este proceso se realiza en la oscuridad para evitar la fotooxidación de la clorofila). Mantener en la nevera durante 24 horas.
4. Clarificar por centrifugación y colocar en tubos spectronic de 2.5mL ajustando el volumen con metanol al 95%.
5. Medir la absorbancia a 665nm contra un blanco de metanol al 95%.

La concentración de clorofila a se obtiene a partir de la ecuación propuesta por Marker (1980):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = ((\text{Abs}_{665} \times 13.14) / \text{VM}) \times \text{VE}$$

VM: Volumen de muestra del cultivo utilizado

VE: Volumen del extracto medido.

Abs: Absorbancia

Método propuesto por Marker (1980).

Anexo 6: Determinación de exopolisacáridos en *Anabaena* sp.

1. Decantar la muestra para obtener un sobrenadante libre de células.
2. Al sobrenadante agregar metanol grado reactivo en proporción 1:1, dejar reposar a temperatura ambiental durante toda la noche.
3. Recolectar y lavar el precipitado con una solución metanol-agua 1:1
4. Secar a 37°C y pesar.

Método propuesto por Shah et al. (2000).

Anexo 7: Tabla de ANOVA de la densidad celular de *Anabaena* sp. entre tratamientos por día.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DIA_0	.000	3	.000	.	.
	.000	8	.000		
	.000	11			
DIA_3	3.122E-02	3	1.041E-02	7.767	.009
	1.072E-02	8	1.340E-03		
	4.194E-02	11			
DIA_6	1.558	3	.519	53.614	.000
	7.750E-02	8	9.687E-03		
	1.636	11			
DIA_9	15.949	3	5.316	4.578	.038
	9.291	8	1.161		
	25.240	11			
DIA_12	77.574	3	25.858	43.266	.000
	4.781	8	.598		
	82.356	11			
DIA_15	41.072	3	13.691	10.018	.004
	10.933	8	1.367		
	52.004	11			
DIA_18	196.309	3	65.436	9.508	.005
	55.060	8	6.882		
	251.369	11			
DIA_21	72.375	3	24.125	13.665	.002
	14.123	8	1.765		
	86.498	11			
DIA_24	93.298	3	31.099	3.703	.062
	67.184	8	8.398		
	160.482	11			
DIA_27	41.469	3	13.823	3.919	.054
	28.216	8	3.527		
	69.685	11			
DIA_30	2.779	3	.926	4.186	.047
	1.770	8	.221		
	4.549	11			

Anexo 8: Tabla de comparaciones múltiples según Sheffé de la densidad celular de *Anabaena* sp. entre tratamientos por día.

Dependent Variable	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
DIA_3	1.00	2.00	4.61111E-02	.030	.531	-5.826986E-02	.150492	
		3.00	1.00	-.106111	.030	.046	-.210492	-1.730139E-03
	4.00	2.00	-6.000000E-02	.030	.327	-.164381	4.43810E-02	
		1.00	1.00	-.130278	.030	.017	-.234659	-2.589681E-02
		2.00	-8.416667E-02	.030	.121	-.188548	2.02143E-02	
DIA_6	1.00	2.00	-.2416667E-02	.030	.881	-.128548	8.02143E-02	
		3.00	2.00	.160278	.080	.332	-.120401	.440956
DIA_9	3.00	1.00	-.731944	.080	.000	-1.012623	-.451266	
		2.00	-571667	.080	.001	-.852345	-.290988	
	4.00	1.00	-.843056	.080	.000	-1.123734	-.562377	
		2.00	-.682778	.080	.000	-.963456	-.402099	
		3.00	-.111111	.080	.612	-.391790	.169567	
DIA_12	1.00	2.00	-.991667	.880	.742	-4.064848	2.081514	
		3.00	1.00	-1.548611	.880	.429	-4.621792	1.524570
	4.00	2.00	-2.540278	.880	.110	-5.613459	.532903	
		1.00	-1.834167	.880	.299	-4.907348	1.239014	
		2.00	-2.825833	.880	.072	-5.899014	.247348	
DIA_15	1.00	2.00	-.285556	.880	.991	-3.358737	2.787625	
		3.00	2.00	-2.561111	.631	.024	-4.765736	-.356486
	3.00	1.00	-3.134722	.631	.008	-5.339347	-.930097	
		2.00	-5.695833	.631	.000	-7.900458	-3.491208	
		1.00	-3.765556	.631	.003	-5.970180	-1.560931	
DIA_18	1.00	2.00	-6.326667	.631	.000	-8.531292	-4.122042	
		3.00	-630833	.631	.802	-2.835458	1.573792	
	3.00	1.00	2.256944	.954	.214	-1.076766	5.590654	
		2.00	-4.348611	.954	.013	-7.682321	-1.014901	
		1.00	-2.091667	.954	.264	-5.425377	1.242043	
DIA_21	1.00	2.00	-4.576944	.954	.010	-7.910654	-1.243234	
		3.00	2.00	-2.320000	.954	.197	-5.653710	1.013710
	4.00	1.00	-2.283333	.954	.996	-3.562043	3.105377	
		2.00	1.308333	2.142	.943	-6.173027	8.789694	
		1.00	-7.813333	2.142	.041	-15.294694	-.331973	
DIA_24	1.00	2.00	-6.505000	2.142	.091	-13.986360	.976360	
		3.00	2.00	-9.408333	2.142	.016	-16.889694	-1.926973
	4.00	1.00	-8.100000	2.142	.034	-15.581360	-.618640	
		2.00	-1.595000	2.142	.904	-9.076360	5.886360	
		3.00	-1.594444	1.085	.568	-5.383498	2.194610	
DIA_27	1.00	2.00	-3.686111	1.085	.057	-7.475165	1.02943	
		3.00	1.00	-1.367222	1.085	.675	-5.156276	2.421832
	4.00	2.00	-5.053333	1.085	.011	-8.842387	-1.264279	
		1.00	-2.961667	1.085	.135	-6.750721	.827387	
		2.00	-6.647778	1.085	.002	-10.436832	-2.858724	
DIA_30	1.00	2.00	-1.594444	1.085	.568	-5.383498	2.194610	
		3.00	2.00	-1.705556	2.366	.912	-9.969684	6.558573
	3.00	1.00	-3.883056	2.366	.483	-12.147184	4.381073	
		2.00	-5.588611	2.366	.215	-13.852739	2.675517	
		1.00	-5.151944	2.366	.269	-13.416073	3.112184	
DIA_30	1.00	2.00	-6.857500	2.366	.109	-15.121628	1.406628	
		3.00	-1.268889	2.366	.960	-9.533017	6.995239	
	4.00	1.00	-8.500000	1.533	.956	-6.205659	4.505659	
		2.00	-2.680556	1.533	.434	-8.036214	2.675103	
		3.00	-3.530556	1.533	.231	-8.886214	1.825103	
DIA_30	1.00	2.00	-3.672222	1.533	.206	-9.027881	1.683436	
		3.00	-4.522222	1.533	.102	-9.877881	.833436	
	4.00	1.00	-.991667	1.533	.934	-6.347325	4.363992	
		2.00	-862778	.384	.247	-2.204302	.478747	
		1.00	-1.65556	.384	.978	-1.507080	1.175969	
DIA_30	1.00	2.00	-1.028333	.384	.144	-2.369858	.313191	
		3.00	1.00	-417222	.384	.761	-1.758747	.924302
	4.00	2.00	-1.280000	.384	.062	-2.621524	6.15244E-02	
		1.00	-251667	.384	.931	-1.593191	1.089858	
		3.00	-251667	.384	.931	-1.593191	1.089858	

Anexo 9: Tabla de comparaciones múltiples LSD de la densidad celular de *Anabaena* sp. entre tratamientos por día.

Dependent Variable	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
DIA_3	1.00	2.00	4.61111E-02	.030	.161	-2.280606E-02	.115028
		3.00	-1.06111	.030	.008	-.175028	-3.719394E-02
	4.00	1.00	-6.00000E-02	.030	.080	-.128917	8.91717E-03
		2.00	-.130278	.030	.002	-.199195	-6.136060E-02
		3.00	-8.416667E-02	.030	.023	-.153084	-1.524949E-02
DIA_6	1.00	2.00	-.2416667E-02	.030	.442	-9.308384E-02	4.47505E-02
		3.00	.160278	.080	.081	-2.503916E-02	.345595
	3.00	1.00	-.731944	.080	.000	-.917261	-.546628
		2.00	-.571667	.080	.000	-.756984	-.386350
		4.00	-.843056	.080	.000	-1.028372	-.657739
DIA_9	1.00	2.00	-.682778	.080	.000	-.868095	-.497461
		3.00	-.111111	.080	.204	-.296428	7.42058E-02
	3.00	1.00	-.991667	.880	.292	-3.020724	1.037390
		2.00	-1.548611	.880	.116	-3.577668	.480446
		4.00	-2.540278	.880	.020	-4.569335	-.511221
DIA_12	1.00	2.00	-1.834167	.880	.071	-3.863224	.194890
		3.00	-2.825833	.880	.012	-4.854890	-.796776
	4.00	1.00	-.285556	.880	.754	-2.314613	1.743502
		2.00	-2.561111	.631	.004	-4.016707	-1.105515
		3.00	-3.134722	.631	.001	-4.590318	-1.679126
DIA_15	1.00	2.00	-5.695833	.631	.000	-7.151429	-4.240237
		3.00	-3.765556	.631	.000	-5.221151	-2.309960
	4.00	1.00	-6.326667	.631	.000	-7.782263	-4.871071
		2.00	-.630833	.631	.347	-2.086429	.824763
		3.00	2.256944	.954	.046	5.58740E-02	4.458015
DIA_18	1.00	2.00	-4.348611	.954	.002	-6.549682	-2.147541
		3.00	-2.091667	.954	.060	-4.292737	.109404
	4.00	1.00	-4.576944	.954	.001	-6.778015	-2.375874
		2.00	-2.320000	.954	.041	-4.521070	-.118930
		3.00	-.228333	.954	.817	-2.429404	1.972737
DIA_21	1.00	2.00	1.308333	2.142	.558	-3.631209	6.247876
		3.00	-7.813333	2.142	.007	-12.752876	-2.873791
	4.00	1.00	-6.505000	2.142	.016	-11.444542	-1.565458
		2.00	-9.408333	2.142	.002	-14.347876	-4.468791
		3.00	-8.100000	2.142	.005	-13.039542	-3.160458
DIA_24	1.00	2.00	-1.595000	2.142	.478	-6.534542	3.344542
		3.00	-1.367222	1.085	.243	-3.868932	1.134488
	4.00	1.00	-3.686111	1.085	.009	-6.187821	-1.184401
		2.00	-5.053333	1.085	.002	-7.555043	-2.551624
		3.00	-2.961667	1.085	.026	-5.463376	-.459957
DIA_27	1.00	2.00	-6.647778	1.085	.000	-9.149488	-4.146068
		3.00	-1.594444	1.085	.180	-4.096154	.907265
	4.00	1.00	-1.705556	2.366	.492	-7.161917	3.750806
		2.00	-3.883056	2.366	.139	-9.339417	1.573306
		3.00	-5.588611	2.366	.046	-11.044973	-.132249
DIA_30	1.00	2.00	-5.151944	2.366	.061	-10.608306	.304417
		3.00	-6.857500	2.366	.020	-12.313862	-1.401138
	4.00	1.00	-1.268889	2.366	.606	-6.725251	4.187473
		2.00	-.850000	1.533	.595	-4.386055	2.686055
		3.00	-2.680556	1.533	.119	-6.216611	.855499
DIA_3	1.00	2.00	-3.530556	1.533	.050	-7.066611	5.49949E-03
		3.00	-3.672222	1.533	.044	-7.208277	-.136167
	4.00	1.00	-4.522222	1.533	.018	-8.058277	-.986167
		2.00	-.991667	1.533	.536	-4.527722	2.544388
		3.00	-1.862778	.384	.055	-1.748515	2.29591E-02
DIA_6	1.00	2.00	-1.65556	.384	.678	-1.051292	.720181
		3.00	-1.028333	.384	.028	-1.914070	-.142597
	4.00	1.00	-4.17222	.384	.309	-1.302959	.468515
		2.00	-1.280000	.384	.010	-2.165737	-.394263
		3.00	-.251667	.384	.531	-1.137403	.634070