



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EXPLORACIÓN DE FUENTES NUTRICIONALES DE *Spirulina* spp. NATIVAS
PROVENIENTES DE LA LAGUNA DE COLTA.

Autora

Erika Vanessa Costales Collaguazo

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EXPLORACIÓN DE FUENTES NUTRICIONALES DE *Spirulina* spp. NATIVAS
PROVENIENTES DE LA LAGUNA DE COLTA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. Carlos Andrés Bastidas

Autora

Erika Vanessa Costales Collaguazo

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el (los) estudiante(s), orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Carlos Andrés Bastidas
Máster en Microbiología Avanzada
C.I. 0201619806

DECLARACIÓN PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Mayra Fernanda Chico Terán

Máster en Biotecnología

C.I 1003327044

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Carlos Junio Falconí Borja
Doctor en Ciencias Naturales
C.I. 0601299878

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Erika Vanessa Costales Collaguazo

C.I. 0604241885

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mis padres por su amor incondicional. A mis hermanos por aconsejarme en cada etapa de mi vida. A mi Tati por recordarme que siempre se puede.

A mis chiquitos pasantes, Silvia, Victoria, Melissa y Santiago por formar parte de esta investigación.

Agradezco al Dr. Carlos Falconí por la apertura en su laboratorio, disposición y apoyo. Al M.Sc. Carlos Bastidas por su orientación y tiempo durante el desarrollo de ésta investigación.

A Stephanie, Jorge, María Fernanda, Monse, por su apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A Mi mami, por ser mi apoyo incondicional, mi mayor motivación y ser la extraordinaria mujer que admiro. Mi papi, por su paciencia y ser el increíble hombre del cual me siento orgullosa.

A Joha, Cristian y Palmiro, por ser los más tiernos y asombrosos hermanos que la vida me ha regalado. Cada uno de ustedes son mi ejemplo de perseverancia, empuje y amor.

A mi familia por tanto cariño.

A todos ustedes les dedico el primero de muchos logros.

RESUMEN

Spirulina sp. es una cianobacteria filamentosa con alto valor nutricional, su uso empírico como suplemento dietético es empleado desde la antigüedad. La popularidad de este alimento se debe a su alto contenido en proteína. Se encuentra presente en diversos ecosistemas entre ellos los lagos alcalinos. La presente investigación se desarrolló en la Laguna de Colta intervenida antrópicamente, considerada una laguna altoandina de Ecuador ubicada a 3420 m.s.n.m. El propósito de éste trabajo fue la identificación, aislamiento y purificación de cepas nativas de *Spirulina* spp. La metodología de muestreo se realizó por zonas y recolección de muestras aleatorias. La identificación se realizó mediante una recopilación de claves dicotómicas. El aislamiento se lo hizo mediante microscopía, diluciones, medios líquidos - sólidos y resiembras. La purificación, se realizó con un aumento de bicarbonato de sodio, combinación de diluciones con aislamiento microscópico y adición de cicloheximida. Las condiciones de crecimiento fueron de 2500-3000 lux de luz artificial, un fotoperiodo de 12h:12h a una temperatura de $21\pm 4^{\circ}\text{C}$ y aireación continua. Los resultados obtenidos de muestreo indicaron que de las 6 zonas designadas, la Zona 1 con 36 muestras fue el área con mayor presencia de *Spirulina*. Se identificó taxonómicamente *Spirulina subsalsa* y *Spirulina major* a través de características morfológicas y microscópicas. Así se determinó que estas cepas nativas están adaptadas a intervenciones antrópicas propias de este ecosistema léntico. La aplicación de estrategias sencillas de purificación permitió establecer monocultivos de un género, con la presencia de las dos especies nativas. Las cuales podrían ser utilizadas comercialmente, posterior a estudios de sus características nutricionales.

ABSTRACT

Spirulina sp. is a filamentous cyanobacteria with high nutritional value, its empirical use as dietary supplement has been used since the antiquity. The popularity of this food is due to its high protein content. It is present in various ecosystems including alkaline lakes. The present investigation was carried out in the Laguna de Colta intervened antropically, considered a high Andean lagoon of Ecuador located at 3420 m.s.n.m. The purpose of this work was the identification, isolation and purification of native strains of *Spirulina* spp. Sampling methodology was performed by zones and random sample collection. Identification was done through a collection of dichotomous keys. The isolation was done by microscopy, dilutions, liquid - solid media and reisolated. Purification was performed with an increase of sodium bicarbonate, combination of dilutions with microscopic isolation and addition of cycloheximide. The growth conditions were 2500-3000 lux of artificial light, a photoperiod of 12h: 12h at a temperature of 21 ± 4 ° C and continuous aeration. The results obtained from sampling indicated that of the 6 designated areas, Zone 1 with 36 samples was the area with greater *Spirulina* presence. Taxonomically, *Spirulina subsalsa* and *Spirulina major* were identified through morphological and microscopic characteristics. Thus it was determined that these native strains are adapted to anthropic interventions typical of this lentic ecosystem. The application of simple purification strategies allowed to establish monocultures of a genus, with the presence of the two native species. Which could be used commercially, after studies of their nutritional characteristics

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Antecedentes	1
1.2	Planteamiento del problema.....	3
1.3	Objetivos	5
1.3.1	Objetivo General.....	5
1.3.2	Objetivo Específicos	5
1.4	Justificación.....	5
2.	MARCO TEÓRICO	6
2.1	Biodiversidad del Ecuador.....	6
2.2	Área de estudio.....	7
2.3	Diversidad microbiológica de ambientes lénticos.....	8
2.3.1	Dominio Bacteria	8
2.3.2	Eutrofización.....	10
2.4	Dragado	12
2.4.1	Efectos negativos	13
2.4.2	Efectos positivos.....	14
2.5	Cianobacterias	15
2.5.1	Características generales	15
2.6	Género <i>Spirulina</i>	17
2.6.1	Taxonomía	17
2.6.2	Especies de <i>Spirulina</i>	18
2.6.3	Morfología	19
2.6.4	Ciclo de vida.....	20
2.7	Potencial social, económico y nutricional de <i>Spirulina</i> spp. 20	
2.7.1	Nutrición	21
2.7.2	Social.....	22
2.7.3	Económico.....	22
3.	DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	23

4.	PROCEDIMIENTOS	25
4.1	Muestreo	25
4.2	Preparación de medios de cultivo	26
4.3	Aislamiento de cepas de <i>Spirulina</i>	30
4.4	Determinación morfológica y taxonómica de <i>Spirulina</i> spp. mediante microscopía.	30
4.5	Purificación de las cepas de <i>Spirulina</i> spp. a través de medios de cultivo sólidos y líquidos.....	31
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1	Muestreo	33
5.2	Determinación de medios de cultivo	47
5.3	Aislamiento de cepas de <i>Spirulina</i>	53
5.4	Determinación morfológica y taxonómica de <i>Spirulina</i> spp..	56
5.4.1	Especie <i>Spirulina subsalsa</i>	57
5.4.2	Especie <i>Spirulina major</i>	59
5.5	Purificación de las cepas de <i>Spirulina</i>	61
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
6.1	Conclusiones	68
6.2	Recomendaciones	68
	REFERENCIAS	69
	ANEXOS.....	89

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Alrededor del mundo existen aproximadamente 100.000 especies distintas de microalgas, de las cuales se estima que 30.000 especies son conocidas (Baicha *et al*, 2016, p.2). Han sido estudiadas por más de 100 años y en la actualidad se refleja la ampliación de su uso en cultivos a gran escala (Brasil *et al*, 2017, p.76). Durante este tiempo, se las ha clasificado según su pigmentación, ciclo de vida, estructura celular, toxicidad, metabolismo, etc. (Brennan y Owende, 2010, p. 559). Su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales ha permitido su sobrevivencia (Mata, Martins y Caetano, 2010, p.219).

El término microalga se refiere a microorganismos fotosintéticos que poseen clorofila además de otros tipos de pigmentos. Pueden ser eucariotas y procariotas fotosintéticos, los cuales habitan ambientes de agua dulce y salada. Crecen de forma relativamente rápida y pueden vivir en ambientes extremos (Baicha *et al*, 2016, p.2; Masojidek y Torzillo, 2014, p. 21; Brennan y Owende, 2010, p. 559).

Una aclaración para el presente trabajo, es que el término microalgas no posee un significado taxonómico. Engloba dos tipos celulares que se contraponen: i) cianobacterias que son procariotas y ii) resto de organismos eucariotas. La diferencia es clara, pero se los ha agrupado dentro de este término debido a que fisiológicamente comparten un metabolismo fotosintético el cual es similar al de plantas superiores (Romo, 2002, p.3; Gómez, 2007, p.4). Se hará referencia a cianobacterias al emplearse en ciertos párrafos el término microalgas, durante el transcurso de este trabajo.

La potencialidad de estos microorganismos fotosintéticos radica en ser una fuente de compuestos que posee un valor comercial como son las

ficobiliproteínas, compuestos bioactivos para la agricultura, carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, etc. Tanto para la industria alimentaria, cosmética, química y farmacéutica, entre otras. Lo que ha fomentado el estudio de más especies y su metabolismo (Valverde, Romero-Campero, León, Guerrero y Serrano, 2016, p.4).

Un ejemplo de investigación dentro de este campo se encuentra la Universidad de Coimbra (Portugal), hasta el año 2010 contaba con 4000 cepas y entre 1000 especies, considerada la colección de microalgas de agua dulce más grande en el mundo. Otro ejemplo se encuentra Alemania, en la Universidad de Goettingen, poseen 2213 cepas con 1273 especies de las cuales el 8% son cianobacterias (Mata, Martins y Caetano, 2010, p.219).

En Ecuador, existen más de 1500 especies de microalgas identificadas (Maldonado *et al.*, 2011, p.19), 106 especies se encuentran presentes en áreas lacustres (Ortiz *et al.*, 2017, p.56). Otro ejemplo en el país, se relaciona con la evaluación en el uso de *Chlorella* sp. y *Synechocystis* sp provenientes de la reserva ecológica Cayambe-Coca, para el tratamiento terciario de aguas residuales (Pachacama *et al.*, 2016,p.140). Ecuador es un país que se caracteriza por poseer una amplia riqueza biológica (Naranjo *et al.*, 2016). La variabilidad biológica de estos hábitats potencia el bioconocimiento de la matriz natural del país (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015, p.16).

Dentro de la riqueza de hábitats naturales, se han dado intervenciones mecánicas para fines económicos, incidentes de perturbación de estos ecosistemas (Gándara, 2011, p.101). Donde, las cianobacterias han desarrollado adaptaciones para lograr sobrevivir y perpetuar su existencia. Como son: la fabricación de exopolisacáridos, formación de comunidades microbianas, convirtiéndolos en pioneros de colonización en superficies que han sufrido un disturbio en su equilibrio ecológico (Chen *et al.*, 2014, p.2). A pesar de su impacto, en el contexto biológico de mecanismos de respuesta y adaptación de las microalgas, sus efectos han sido poco estudiados (Delattre,

Pierre, Laroche y Michaud, 2016, p.9) y sobretodo en microalgas nativas las cuales pueden tener un potencial biotecnológico.

Actualmente, se ha visto un creciente interés biotecnológico en microalgas. Debido a su eficiencia fotosintética, estos microorganismos contribuyen globalmente hasta el 25% de la productividad fotosintética (Valverde *et al*, 2016, p.4). El impulso en el avance de investigaciones científicas, dentro de sus múltiples objetivos, se encuentra el identificar especies para lograr eficientes producciones de biomasa. Establecimiento de modos de operación distintos, ampliación de medios de cultivo con requerimientos específicos (Baicha *et al*, 2016, p.2). Además, del uso de herramientas biotecnológicas, las cuales permitan determinar con precisión en género y especie sus características moleculares. Con el fin de generar información de propiedades y particularidades que contribuyan a la industria (Ortiz *et al*, 2017, p.57).

1.2 Planteamiento del problema

Ecuador forma parte del grupo de países con elevados indicadores de pobreza extrema, subnutrición y desnutrición crónica en población infantil. Donde las áreas rurales son el objetivo de campañas de prevención, promoción y Estrategia de Acción en Nutrición (FAO, 2013).

La provincia de Chimborazo, posee el 71,7% de empleo inadecuado. El cantón Colta es un ejemplo dentro de las áreas rurales con este tipo de problemas que muestra la Encuesta de Condiciones de vida del año 2014 (Inec, 2015). Los más altos índices de desnutrición crónica poseen las provincias Chimborazo, Cotopaxi y Bolívar en la población menor de cinco años, resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del año 2012 (Unicef, 2016, p.1).

En consecuencia, el gobierno se ha planteado desde el año 2013 el Plan Nacional para el Buen Vivir. Concordando con el cambio de la matriz

productiva, al cumplir el papel de estrategia para la potenciación de capacidades productivas. Empezando acciones para afrontar entre algunas metas: la desnutrición, desempleo, inclusión social, etc. (Buen Vivir, 2013, pp. 64, 73). Generando resultados, como el fortalecimiento de la producción, al iniciar con capacitaciones dirigidas hacia los productores para ser un apoyo al crecimiento del sector. Pero la ciencia y tecnología, es un rubro que aún no se destaca por su notable inversión (Caicedo *et al*, 2016, p.84).

Se ha iniciado con proyectos, como el catálogo nacional de microalgas en La Corporación para la investigación Energética del Ecuador. Con el fin de identificar y recolectar cepas de zonas protegidas del país (Dicyt, 2016, p.1). Dado la diversidad de ecosistemas en que pueden habitar las microalgas, se ha iniciado investigaciones de sus beneficios (Bonilla, 2009, p.1). *Spirulina* es una cianobacteria que ha despertado en los últimos años gran interés dada sus propiedades.

Existen estudios acerca de los beneficios nutricionales de *Spirulina*, los cuales han sido utilizados en el desarrollo de productos como suplementos alimenticios (Santos, Bastos de Freitas, Moreira, Zanfonato, Costa, 2016, p.1). Entre las características más destacables se encuentran su alto contenido (hasta 70%) de proteína en peso seco (Ghaeni y Roomiani, 2016, p.114), vitaminas B12 y provitamina A (β -carotenos), minerales como el hierro (Habib, Huntington, Parvin y Hasan, 2008, p.10). Además de ácidos γ -linoléico, tocoferoles y ácidos fenólicos (Karkos *et al*, 2011, p.1). El Instituto Intergubernamental para el uso de microalgas, recomienda *Spirulina* para consumo alimenticio y aliado en la desnutrición (IIMSAM, 2016).

La oportunidad de un desarrollo socio económico, conjuntamente con investigaciones de microorganismos con potencial nutricional como económico. Abre soluciones a problemáticas sociales (Bortz y Di Bello, 2015, p.23). Por lo tanto, se evidencia la necesidad de plantear un trabajo investigativo con el fin de explorar cepas nativas de *Spirulina* que se han adaptado a intervenciones

antrópicas y forman parte de la cadena trófica dentro de un ecosistema léntico, como es la Laguna de Colta.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Identificar cepas de *Spirulina* spp. nativas presente en la Laguna de Colta.

1.3.2 Objetivo Específicos

- Determinar morfológica y taxonómicamente *Spirulina* spp. mediante microscopía.
- Aislar y purificar cepas de *Spirulina* spp. a través de medios específicos y resiembra

1.4 Justificación

En el año 2013, la Corporación para la Investigación Energética creó el Laboratorio de Biotecnología Energética, BIOTEC, con respaldo de la Empresa Eléctrica Quito S.A. El objetivo de la investigación es el estudio de la biodiversidad de microalgas del país como sus aplicaciones biotecnológicas. Resaltando la posibilidad de nuevas líneas de investigación, que impulse ésta nueva área de estudio (Biotec, 2015, p.1).

Varios estudios han conducido a investigaciones acerca de la biodiversidad de microalgas. Considerándolas como una fuente de nuevos productos y aplicaciones potenciales tanto en sectores de salud, alimenticios, energéticos como industriales (De Morais, Da Silva, Henrard y Costa, 2015, p.2).

La Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y tecnología, dio a conocer el proyecto catálogo nacional de microalgas que se desarrolla en La Corporación para la investigación Energética del Ecuador. Las cepas son

recolectadas e identificadas, de lagunas o sistemas lacustres ubicados en zonas protegidas. El uso más difundido de microalgas es en alimentación, biorremediación, industria y con fines energéticos (Dicyt, 2016, p.1).

La importancia de éste trabajo radica en la contribución de información específica de ésta área natural. Relacionando la biodiversidad de microalgas nativas, con su capacidad de adaptación a condiciones ambientales posterior a una actividad antrópica. El enfoque principal de la investigación, es la identificación de cepas de *Spirulina* spp. como fuente nutricional para el beneficio de la población y el bioconocimiento de la diversidad autóctona de los ecosistemas del país.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biodiversidad del Ecuador

La diversidad de climas y geomorfología en América del Sur se ha traducido en variedad de lagos y lagunas. El origen de estos cuerpos de agua puede ser por actividad tectónica, glacial, presencia de volcanes; acción fluvial, eólica, marítima y humana. En toda Suramérica el origen de cuencas lacustres se ha dado por represamiento, producto de la actividad humana, por otra parte en los Andes se ha dado la presencia de lagos por actividades tectónicas y glaciales (Llames y Zararese, 2009, p.1).

Dentro de Sudamérica, Ecuador destaca al ser uno de los 17 países con mayor biodiversidad del planeta (Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones – PRO ECUADOR, 2016, p.5). Las regiones andinas ecuatorianas poseen una alta diversidad de cianobacterias, influido por su ubicación, luz solar entre otras condiciones ambientales (Ortiz *et al*, 2017, p.56). A nivel mundial, es el segundo país en endemismo (Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones – PRO ECUADOR, 2016, p.5).

2.2 Área de estudio

La Laguna de Colta forma parte de la riqueza natural del país dentro de los ecosistemas lénticos. Ubicada en la provincia de Chimborazo, representa aproximadamente 200 hectáreas de área total. Se encuentra a 3420 m.s.n.m., con una temperatura de 12°-15°C (Municipio de Colta, 2013, p.1). Situada entre las parroquias de Santiago de Quito y Sicalpa. Su ubicación georeferencial: 01°45'S, 78°44'W, 15 Km al suroeste de Riobamba (Jaramillo, 2015, p.3). Originada hace aproximadamente 2.000 años producto de la interrupción de una corriente de lava en el río Colta. La Laguna de Colta es un recurso hídrico natural y cultural, considerado como un espacio simbólico de conciencia étnica del lugar (Amores *et al*, 2005, p.377).

Se encuentra rodeada de varias comunidades indígenas. Dentro de la flora y fauna del lugar, destacan la totora (*Scirpus* sp.), así como el hábitat de especies de aves altoandinas y migratorias como Praderito Canelo (*Tryngites subruficollis*) (López y Bianco, 2005, p.67; Santander, Lara y Muñoz, 2007, p.4).

Forma parte del grupo de Lagunas Altoandinas, escenario del avistamiento de la Gaviota Reidora (*Leucophaeus atricilla*). Es una especie común pero rara en tierra adentro, se ha reportado su presencia sólo en la Laguna de Yambo, Laguna de Colta y Papallacta (Santander, Terán, Mueces, Lara, Llumiquinga y Guevara, 2011, pp.106, 107). Además, dentro de la diversidad de la laguna se destaca la presencia de especies de patos, únicos y propios del lugar, lo que dio a lugar al bautizo de la laguna como la de patos o Kulta Kucha (Municipio de Colta, 2013, p.1).

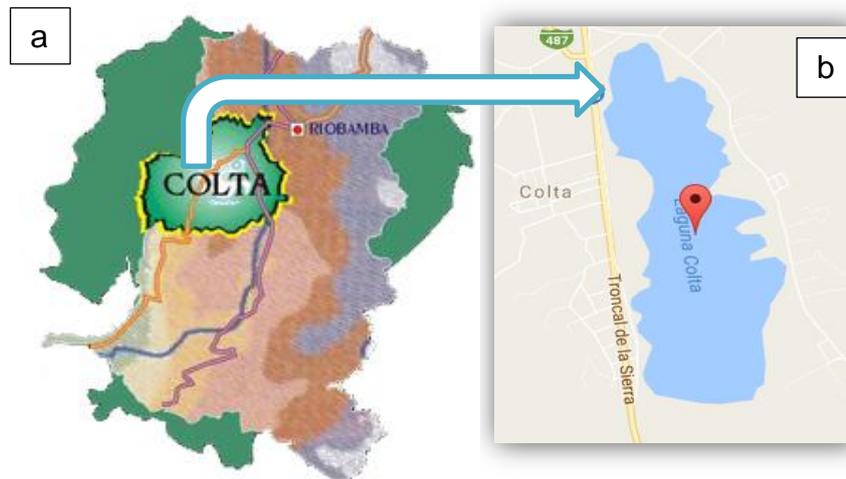


Figura 1. Ubicación geográfica.

Tomado de (Municipio de Colta, 2013, p.1; Google Maps, 2016) Respectivamente.

- a) Cantón Colta.
- b) Laguna de Colta.

2.3 Diversidad microbiológica de ambientes lénticos

2.3.1 Dominio Bacteria

El dominio bacteria se conforma de bacterias relacionadas o emparentadas con mitocondrias y cloroplastos (Campbell y Reece, 2007, p. 507). También, conocido como Eubacteria, poseen exclusivamente a organismos celulares procariotas (Wassenaar, 2011, p.16).

Entre sus características, como todo ser viviente es la generación de descendencia en las condiciones del ambiente que habitan. Se ha observado que, pueden adaptarse a condiciones extremas para su sobrevivencia (Wassenaar, 2011, p.7).

El primer ambiente en el cual se observó células microbianas fue en muestras de agua dulce, a lo largo de investigaciones se concluyó que sólo una pequeña

fracción de microorganismos es recuperable en cultivos puros. Por lo que, aún no es posible para algunos tipos de microorganismos tener un crecimiento en medio de cultivo. Antes de la utilización de enfoques taxonómicos moleculares, se empleaba la morfología celular, los microorganismos que podía ser cultivados y obtenerlos puros contribuían en una pequeña fracción (Youssef, Couger, McCully, Criado y Elshahed, 2015, p.271).

Por consiguiente, se dio paso al uso del gen 16S ARN, considerado como una herramienta molecular estandarizada, siendo el marcador filogenético más usado. Se basa en la amplificación de una región del ADN mitocondrial, un fragmento de 600 pares de bases que codifica la subunidad I del citocromo c oxidasa. Permitió la clasificación taxonómica y también la identificación de especies (Valenzuela, Casillas, Villalpando, Vargas y Harris, 2015, p.299).

En la actualidad, la identificación de nuevos linajes ha demostrado la amplitud de la diversidad filogenética, que existe en los numerosos ambientes de la naturaleza. Lo que ha exigido modificar los esquemas taxonómicos (Youssef, Couger, McCully, Criado y Elshahed, 2015. p.273).

Las cianobacterias pertenecen al dominio bacteria, donde destaca su papel en el planeta como fotosintetizadores con liberación de oxígeno (Torres, 2004, p.44) lo cual permitió la creación de la atmósfera. Entre sus condiciones ambientales, puede darse casos de abundancia de nutrientes en la columna de agua. Los cuales pueden producir varios efectos, entre ellos floraciones que pueden dar a lugar a agrupamientos de cianobacterias o de algas en la superficie del agua. Cuando se genera eutrofización o intromisión antrópica intensa, puede generarse la muerte de los organismos en el cuerpo de agua y la pérdida del ecosistema.

2.3.2 Eutrofización

El aumento de la productividad primaria es el resultado del aumento de nutrientes, especialmente nitratos y fosfatos (Erazo y Cárdenas, 2013, p.140). Ocasionalmente un cambio en el estado trófico del ambiente acuático, a este fenómeno se lo denomina eutrofización. En estaciones del año se puede dar un incremento de nutrientes o floraciones dentro del sistema acuático. Pero, una variación por entrada de nutrientes a un nivel superior puede producir graves cambios (Serediak, Prepas, Putz, 2014, p. 317).

Estos cambios se miden en el transcurso del tiempo, un cuerpo de agua pequeño inicia siendo oligotrófico (poca concentración de nutrientes), a medida que avanza el tiempo puede aumentar los sedimentos. Lo que produce cambio en la profundidad, forma, volumen y alteraciones químicas. El aceleramiento de procesos de eutrofización, pueden generar problemas no reversibles. En la Figura 2 se muestra un ejemplo gráfico: (Serediak, Prepas, Putz, 2014, p.317).



Figura 2. Comparación de un ecosistemas equilibrado vs uno con eutrofización. Tomado de (Gallardo, 2009, p.10).

Eutrofización por actividades antrópicas

El efecto directo de la concentración de nutrientes, por actividades agrícolas o asentamientos permanentes contribuyen al impacto dentro de un ecosistema

(Serediak, Prepas, Putz, 2014, p. 317). Como se puede observar en la Figura 3, una eutrofización natural puede producir un efecto menor en el ecosistema. En comparación a una eutrofización antrópica o cultural, en la que puede llegar a desaparecer la vida silvestre del ecosistema (Samboni, 2015, p.1).

Algunos ejemplos de actividades que pueden producir eutrofización son: actividad industrial, actividad agrícola empleando fertilizantes, pesticidas organofosforados. También, la falta de depuración en el tratamiento de aguas residuales (Erazo y Cárdenas, 2013, p.140), actividades de construcción y la falta de protección ambiental en zonas sensibles pueden ocasionar eutrofización.

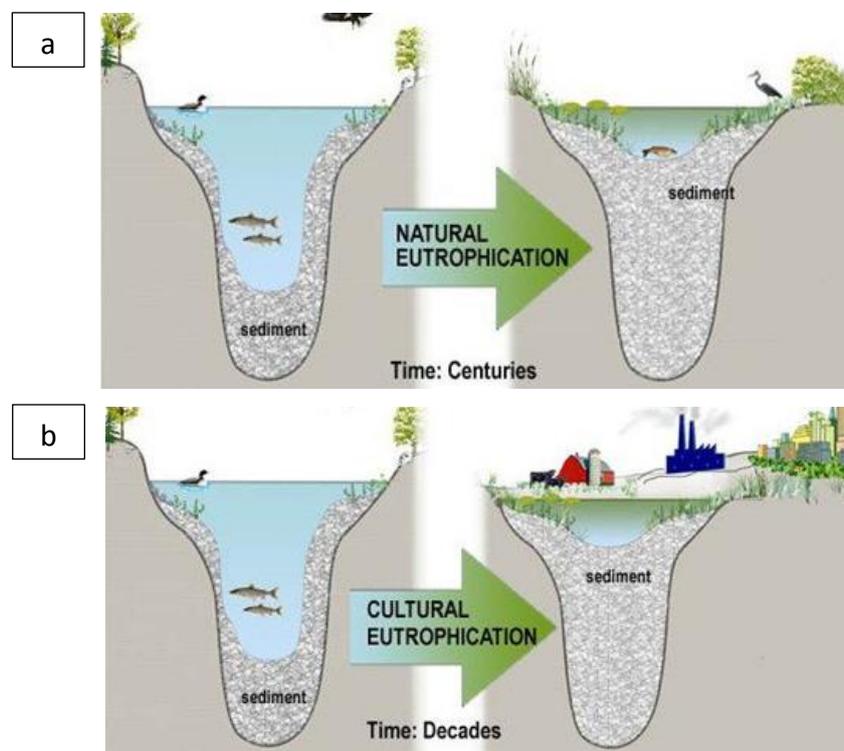


Figura 3. Eutrofización.

Tomado de (Samboni, 2015, p.1).

a) Proceso de eutrofización natural

b) Proceso de eutrofización cultural o por actividades antrópicas.

Nota: Comparación gráfica entre una eutrofización natural con presencia de especies, en relación a una eutrofización antrópica con decrecimiento o desaparición de especies del ecosistema.

Las actividades realizadas por el hombre producen un exceso anormal en los nutrientes, ya presentes en el cuerpo de agua. La forma de mitigar o disminuir estos efectos aún no se conoce en su totalidad (Serediak, Prepas y Putz, 2014, p. 317).

Por lo que el planteamiento de proyectos empleando el dragado como vía para recuperación de ecosistemas busca beneficiar la economía del lugar (Basílico, De Cabo, Faggi, 2013, p.1). El uso más reciente del dragado, es la recuperación medioambiental. En forma de eliminación o limpieza de sedimentos en aguas navegables o rehabilitación de zonas (Bray, Cohen, 2010, p.10). Este objetivo es común en diferentes países, donde la intervención en el mantenimiento y recuperación de sus ecosistemas son parte fundamental de su desarrollo (Basílico *et al*, 2013, p.1). En Ecuador, en el año 2013, se planteó la intervención para la restauración ecológica en el sur y suroeste del estero salado de Guayaquil. Aplicado técnicas como, el dragado de lodos contaminados con el fin de tratar los sedimentos (Ministerio de desarrollo urbano y vivienda, 2013, p.21).

2.4 Dragado

El proceso de dragado reside en la remoción de lodo ubicado en la base de las masas de agua producido por la caída de presión, se ejecuta por medio de maquinaria específica para el área a dragar. Los ecosistemas en los que se intervienen pueden verse afectados (Gándara, 2011, p.101).

Las actividades en las cuales se emplea el dragado son: recuperación de tierra, construcciones de puertos, regeneración de playas, etc. Las cuales son actividades cuya finalidad es satisfacer la demanda económica y social. Se desarrolla el proceso en 3 etapas: excavación, transporte y finalmente la eliminación del material (Manap y Voulvoulis, 2016, p.21).

Como resultado de esta actividad, se han generado diversas conclusiones. En literatura relacionada indica que los efectos son más notorios en hábitats sensibles que en un ecosistema marino (Erftemeijer, Riegl, Hoeksema y Todd, 2012, p. 1738). Entre los efectos registrados se encuentra, la atenuación de luz, altas concentraciones de sedimentos que están en suspensión en el cuerpo de agua, etc. (Erftemeijer, Riegl, Hoeksema y Todd, 2012, p. 1739).

Las operaciones del dragado generan en el ecosistema intervenido, de forma directa o indirecta efectos negativos y positivos. Los cuales se evidencian en las condiciones físicas, químicas y biológicas. Existen efectos conocidos como la turbidez del cuerpo de agua y otros que bajo investigaciones detalladas pueden dar lugar a una ventaja o desventaja ambiental en el área de descarga o de intrusión.

2.4.1 Efectos negativos

Un ejemplo de hábitat sensible, se considera a los arrecifes de coral, los cuales en ocasiones por operaciones de dragado se ha enfrentado a eliminación, entierro o generación de estrés lo que ha producido cambios fisiológicos en algunas de sus especies. También, puede darse en áreas cercanas con la liberación de contaminantes, variación batimétrica, entre otros. Pueden ser efectos permanentes o temporales, la adaptación de las especies que habitan en el ecosistema depende si son más sensibles unas de otras (Erftemeijer, Riegl, Hoeksema y Todd, 2012, p. 1738).

Además, en lugares muy contaminados, el uso de redes y maquinaria de excavación puede ocasionar un riesgo alto en la degradación de parámetros ambientales propios del ecosistema intervenido (Manap y Voulvoulis, 2016, p.22).

Otro efecto relacionado al dragado, es la variación del flujo de agua. Una investigación en China, en el estuario Modaomen buscó como objetivo

desarrollar un modelo analítico para evaluar efectos de actividades antrópicas. Puede darse la propagación de tormentas dentro del cuerpo de agua, provocando un aumento en el riesgo de inundaciones (Cai, Savenije, Yang, Ou, y Lei, 2012, p.885).

2.4.2 Efectos positivos

Por otra parte, se debe considerar las condiciones locales y el periodo del año, los cuales influyen en la respuesta ambiental debido a la variación de las condiciones climáticas durante la operación del dragado. Dado que las variables para determinar el impacto en un ecosistema, no son completamente generalizadas. La información de los efectos de dragado se puede encontrar en: informes evaluativos, artículos científicos generados a nivel de laboratorio, evaluaciones de impacto ambiental, consultoría e informes técnicos (Erftemeijer *et al*, 2012, p. 1738).

Uno de los efectos, la turbidez que se genera en un proceso de dragado, basándose en estudios anteriores puede llegar a ser temporal. La resuspensión de los sedimentos, es similar a lo causado por tormentas, pesca, entre otras actividades humanas (Manap y Voulvoulis, 2016, p.21).

En Ecuador, desde el 2011 se emprendió un proyecto de recuperación y manejo de la Laguna de Colta. La ciudadanía se benefició de 75.678 m³ de sedimento dragado, 12 hectáreas de totora retirada y 4900 jornales (Ministerio del Ambiente, 2011). Se retomó los labores de extracción y disposición de la materia orgánica (totora), así como la extracción de sustrato orgánico mineral (Jaramillo, 2015, p.2).

En particular, en la Laguna de Colta la aplicación de éste procedimiento representó la recuperación del área de la Laguna (Jaramillo, 2015, p.5), pero la variación o influencia en la parte biológica dentro del proceso no se consideró, ni el desarrollo de eutrofización que sufre la Laguna.

Por lo tanto, los cambios en los parámetros físico-químicos como el desequilibrio del ecosistema son consecuencias resultantes durante un proceso de dragado. Pero, la generalización de sus resultados no es para todos los casos. El análisis del manejo y características propias de cada hábitat debe suponer consecuencias específicas por hábitat (Manap y Voulvoulis, 2016, p.6).

2.5 Cianobacterias

Las cianobacterias también conocidas como Cianofitas, *Cyanophyceae*, *Cyanoprokaryota*, algas azul-verde o bacterias azul verdosas (Dvořák *et al*, 2015, p.740), se encuentran presentes de forma natural en agua dulce como lagos, embalses, ríos de flujo lento, lagunas y estuarios (Bengtsson, Herschy, Fairbridge, 2012). Posee una variabilidad de estructuras y morfologías desde unicelulares a formas filamentosas. Dentro de algunos de sus géneros se puede apreciar la diferenciación celular, como es la presencia de heterocitos, entre otras características (Dvořák *et al*, 2015, p.740).

Entre sus requerimientos para crecimiento, las cianobacterias necesitan longitud de onda de 400-700 nm, una fuente de carbono inorgánica, la concentración de fósforo, la química del agua en donde habitan y temperatura del agua. Cada género posee sus requerimientos, pero algunos rangos coincide como la T° 25-35°C, pH 7,5 a 9 (Bengtsson, Herschy, Fairbridge, 2012).

2.5.1 Características generales

Dentro de las características de morfología de cianobacterias, abarcan en tamaño desde 0,5µm hasta colonias macroscópicas. Existe el nivel filamentosos y colonial, siendo el nivel filamentosos el más representativo dentro del plancton. Algunas especies posee células especializadas (heterocitos), un ejemplo de

estos son los órdenes *Stigonematales* y *Nostocales*. El objetivo de éstas células diferenciadas es fijar el nitrógeno atmosférico (Bonilla, 2009, p.9; Dvořák *et al*, 2015, p.740).

También, existen células de resistencia partir de una célula vegetativa son llamadas acinetes o acinetos. Cumplen el papel de acumulación (Cameán y Repetto, 2012,p.170) y engrosamiento de la pared celular, con el fin de responder a condiciones de estrés ambiental. Ejemplo de estos se encuentra el orden *Nostocales* y *Stigonematales* (Bonilla, 2009, p.9). Acumulan glicógeno, pigmentos carotenoides, lípidos y cianoficina. Toleran la congelación, secado y en periodos largos de almacenamiento anóxicos (Castenholz, 2001, p.7)

Las cianobacterias filamentosas se puede encontrar con filamentos ramificados, no es una característica usual de las cianobacterias planctónicas pero existen dentro de estos microorganismos complejos (Bonilla, 2009, p.9). Las ramificaciones pueden ser falsas o verdaderas. La ramificación falsa, conduce a la formación de dos filamentos envueltos dentro de la misma capa mucilaginoso. En cambio la ramificación verdadera, las células en un solo filamento empieza a dividirse en más planos (Whitton y Potts, 2007, p.3).

La propagación de los filamentos se da por fragmentación en puntos frágiles donde se quiebran y generan la muerte programada del necridio (nombre asignado a ésta célula). Los trozos pequeños de los filamentos, son llamados hormogonias, que posterior por fisión binaria se multiplicarán (Bonilla, 2009, p.9). Son cadenas entre 5 a 15 células, su formación y fragmentación se asocia al parecer a condiciones ambientales (Castenholz, 2001, p.7).

Otra características de las cianobacterias es la presencia de clorofila a. Es un pigmento universal conocido para realizar la fotosíntesis aeróbica. Las cianobacterias contienen tilacoides, que son sistemas de membranas internas que funcionan como lugar de captación de luz de la fotosíntesis (Sadava y Purves, 2009, p.573). La diversidad de características entre especies, también da a lugar la presencia de clorofila b y clorofila d. Pero, el color característico lo

da las ficobilinas asociadas a proteínas, existen 3 grupos: alloficocianinas, ficocianina y ficoeritrina (Bonilla, 2009, p.9).

2.6 Género *Spirulina*

El género *Spirulina* se compone del grupo de cianobacterias multicelulares filamentosas, entre sus principales características es su hábitat en ambientes alcalinos (Pelizer, De Carvalho y De Oliveira Moraes, 2015, p.70). En la Tabla 1 se puede observar 6 características que difieren entre el Género *Arthrospira* y el Género *Spirulina*, permitiendo tener diferencias de ambos géneros.

Tabla 1.

Características que separan el Género Arthrospira del género Spirulina

Carácter	<i>Arthrospira</i>	<i>Spirulina</i>
Diámetro del tricoma	2,5-16 um	0,5-5um
Tipo de hélice	Hélice abierta	Hélice cerrada
Septos	Visibles al microscopio	Invisibles al microscopio
Patrón de los poros de la pared celular	Una fila alrededor del tricoma	Varias filas en la pared cóncava de la hélice
Tipo de fragmentación	Intracelular	Intercelular
Cuerpos cilíndricos	Presentes	Ausentes

Tomado de (Ramírez y Olvera, 2006, p.1).

Nota: Comparación de 6 características para definir el género *Arthrospira* del género *Spirulina*.

2.6.1 Taxonomía

En 1829, se empleó el término *Spirulina* por Turpin ex Gomont, pero fue en el año 1989, que se reconoció como género *Spirulina* según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey. La clasificación taxonómica al que pertenece *Spirulina*, se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Descripción taxonómica.

RANGO	NOMBRE
Dominio	Bacteria
Filo	Cyanobacteria
Clase	Cyanophyceae
Orden	Spirulinales
Familia	Spirulinaceae
Género	<i>Spirulina</i>
Especie	<i>subsalsa, versicolor, major, platensis</i>

Tomado de (Guiry, M. y Guiry, G., 2016, p.1)

Nota: La descripción taxonómica representa el agrupamiento e identificación de especies, mostrando las categorías taxonómicas establecidas mundialmente.

2.6.2 Especies de *Spirulina*

En la actualidad, dentro de la base de datos de Algae Base, constan 111 especies, de las cuales 55 nombres de especies son aceptados taxonómicamente. Como se observa en la Tabla 3, existen 27 nombres que representan las especies existentes hasta la revisión actual de la base de datos (Guiry, M y Guiry, G, 2016,p.1).

Tabla 3.

Diferentes especies dentro del Género Spirulina

ESPECIES		
<i>Spirulina abbreviata</i>	<i>Spirulina curta</i>	<i>Spirulina major</i>
<i>Spirulina adriatica</i>	<i>Spirulina duplex</i>	<i>Spirulina mariae</i>
<i>Spirulina aeruginea</i>	<i>Spirulina erdosensis</i>	<i>Spirulina mediterranea</i>
<i>Spirulina agilis</i>	<i>Spirulina flavovirens</i>	<i>Spirulina meneghiniana</i>
<i>Spirulina albida</i>	<i>Spirulina gessneri</i>	<i>Spirulina minima</i>
<i>Spirulina allansonii</i>	<i>Spirulina gomontii</i>	<i>Spirulina mukdensis</i>
<i>Spirulina anjalensis</i>	<i>Spirulina gordiana</i>	<i>Spirulina nodosa</i>
<i>Spirulina attenuata</i>	<i>Spirulina gracilis</i>	<i>Spirulina nordstedtii</i>
<i>Spirulina baltica</i>	<i>Spirulina innatans</i>	<i>Spirulina platensis</i>

Adaptado de (Guiry M. y Guiry, G, 2016, p.1).

2.6.3 Morfología

Spirulina posee una forma no septada mientras que el género *Arthrospira* posee la forma septada (paredes transversales en los filamentos). Posee filamentos simples (tricomos), que se constituyen de células cilíndricas. Este género no posee septos (pared que delimita las células de forma transversal), forman una hélice cerrada (Gershwin y Belay, 2007, p.3; Vonshak, 1997, p.2).

Es fotosintética, se reproduce por fisión binaria. Ostenta de tricomas considerados filamentos, los cuales en su interior se encuentran formados por células cilíndricas. Poseen alineación espiral o dependiendo de la especie una alineación recta. Una característica principal es la forma helicoidal de los filamentos, los cuales en conjunto con la presencia de vacuolas llenas de gas, da como resultado esferas flotantes (Wan, Wu, y Kuča, 2016, p.570).

Además, la geometría de la hélice depende de factores ambientales tanto químicos como físicos, pero principalmente de la temperatura. La forma helicoidal se considera una propiedad estable, aunque puede darse variaciones entre cepas de la misma especie. Generarse poblaciones monoespecíficas de forma natural y se ha dado el caso en cultivos espontáneos la presencia de tricomas rectos o casi rectos (Ali y Saleh, 2012, p.10).

Una mutación puede ser la clave de ésta característica fenotípica, dado que los tricomas se ven afectados por condiciones de crecimiento. lo que puede sugerir que en los plásmidos se dé el carácter de helicidad (Ali y Saleh, 2012, p.10).

En función de la especie se presenta variación de las dimensiones celulares, el enrollamiento celular y la longitud que poseen los filamentos. Los filamentos pueden poseer longitud desde 5 hasta 500 micras. El diámetro varía desde 0,5- 3 a 12 micras (Wan, Wu, y Kuča, 2016, p.570).

2.6.4 Ciclo de vida

El ciclo de vida consiste en tres etapas: iniciando con la fragmentación de tricomas, en continuación las células hormogonias (fragamento del tricoma), comienzan un proceso de ampliación y maduración, para finalmente entrar al alargamiento de los tricomas. Una vez que los tricomas estén maduros, se dividen en filamentos o hormogonia, como se puede observar en la Figura 4, el ciclo vuelve a iniciar. Las células en las hormogonias pueden aumentarse mediante fisión binaria, tiene un crecimiento a lo largo y toma la forma helicoidal propia del género (Ali y Sahel, 2012, p.11) (Mishra *et al*, 2013, p.23).

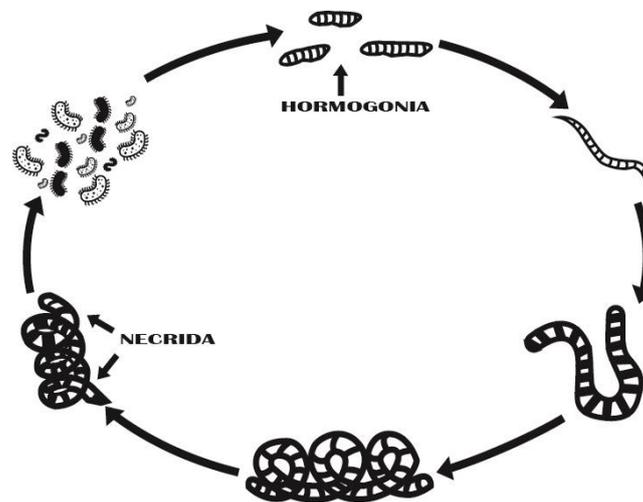


Figura 4. Ciclo de vida: Proceso compuesto por 3 etapas.

Tomado de (Ali y Saleh, 2012, p.11).

2.7 Potencial social, económico y nutricional de *Spirulina* spp.

El potencial que posee la *Spirulina* reside en ser una fuente rica de minerales, vitaminas, proteínas, además de pigmentos naturales, entre otros componentes. En los dos primeros meses del año 2010, se publicaron 7 investigaciones en revistas indexadas, relacionadas al uso de *Spirulina* como suplemento dietético (Ravi *et al*, 2010, p.73). Otros estudios, investigan la

eficacia y el potencial de aplicaciones clínicas de *Spirulina* para el tratamiento de enfermedades incluso efectos antivirales, anticancerígenos y antialérgico (Karkos *et al*, 2011, p.1). Todos estos trabajos investigativos, permiten diversificar el uso de las propiedades naturales de estas cianobacterias tanto para el ámbito nutricional, social y económico.

2.7.1 Nutrición

En la industria de alimentos saludables se ha posicionado en popularidad, dado su alto contenido en micronutrientes y macronutrientes. Su uso proviene desde la antigüedad, en forma natural en lagos alcalinos permitiendo a sus pobladores emplear de forma empírica como un suplemento dietético (Wan, Wu, y Kuča, 2016, p.569), como el caso de México.

Entre sus múltiples aplicaciones, se destaca su uso en la nutrición humana, complementos alimenticios en la alimentación animal, entre otros (Rendón, Ramírez y Vélez, 2013, p.55). Lo que representa un campo de investigación amplia para éste género.

En el área de salud, se han producido nutraceuticos basados en *Spirulina*, además de su prometedor efecto en la protección con la insuficiencia renal, crecimiento de *Lactobacillus* intestinal, prevención de enfermedades cardiovasculares, etc. Se han aislado de fuentes de microalgas varios compuestos antioxidantes, que pueden combatir contra el estrés oxidativo (Suganya, Varman, Masjuki, y Renganathan, 2016, p.925).

Debido a su potencial, es en la actualidad producido y cultivado desde invernadero hasta estanques de forma comercial. Su crecimiento y producción, han influido en ser considerado el alimento del futuro, que se refleja en el aumento de investigación en sus activos nutricionales (Wan, Wu, y Kuča, 2016, p.570).

2.7.2 Social

La fomentación del cultivo de *Spirulina* en niveles internos de producción en países de desarrollo, ha permitido la expansión del cultivo a escala comercial. Mediante la participación de los agricultores, se ha empezado a distribuir su producción con fines de escala comercial como para el uso doméstico en lugares donde se ven afectados por desnutrición o presenta cuadros de enfermedades carenciales (Mishra *et al*, 2013, p.23).

Además, es factible el cultivo de *Spirulina* para el consumo personal, su realización es sencilla. Se puede construir mediante un invernadero casero manteniendo las condiciones locales y la entrada de luz. Un punto principal de este cultivo, es el recrear el medio en el que crece de forma natural la *Spirulina*, siendo una solución de sales que brinda los elementos esenciales para su cultivo y producción (Mishra *et al*, 2013, p.23).

2.7.3 Económico

La *Spirulina* es considerada como un súper alimento, que ha ido aumentando su popularidad. La producción de ésta cianobacteria, puede ser de bajo costo pero también en función de la calidad de la infraestructura y operaciones unitarias que pasa el producto, puede alzarse el costo. A pesar de esto, existe disposición de clientes a pagar el precio por un producto de alta calidad. Lo que posibilita un mercado, usando su principal característica nutricional (Mendoza *et al*, 2011, p.24).

La rapidez con la cual crecen las microalgas, ha despertado el interés de científicos como de inversionistas. Fue en el año 1994, cuando se dio a conocer sobre su rendimiento. En comparación a la soya, *Spirulina* fue 20 veces mayor evaluándolos en una unidad de superficie (Henrikson, 1994, p.39). Un gramo diario de microalgas es una opción para la complementación de la dieta de una persona (Gómez, Tirado, Posada, 2012, p.4).

La gran variedad de bebidas, alimentos, productos de salud, suplementos, entre otros múltiples productos con valor añadido, abre las puertas a la potencialidad de su rentabilidad económica (Mendoza, De la Jara y Portillo, 2011, p.24). Pero, una cifra reducida de especies puede llegar a frenar la explotación comercial, así como países con mayor nivel de tecnología (Mendoza, De la Jara y Portillo, 2011, p.10).

3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se identificó especies de *Spirulina* spp. nativas, como fuente nutricional procedentes de la Laguna de Colta. Para lo cual, se consideró como variable dependiente la presencia de *Spirulina* y variable independiente las zonas de intervención de dragado. Se empleó un análisis estadístico: prueba H de Kruskal Wallis y prueba de Chi cuadrado que permitió analizar la dependencia de las variables. Se inició delimitando las zonas, en función del tiempo transcurrido del dragado. En cada zona de muestreo se recogió un volumen de 0,5L de agua. Posterior a la recolección, se continuó con el traslado de las muestras hacia Quito. Se utilizó durante la investigación, microscopio, pH-metro, GPS, cámara de flujo. En el Laboratorio Plantsphere, se procedió a realizar el análisis biológico de las microalgas recolectadas. Se consideró las características morfológicas y microscópicas para la identificación taxonómica. El aislamiento y purificación se realizó mediante diluciones y experimentación de medios.

A continuación, en la figura 5 se muestra un diagrama de procedimientos. El cual resume las etapas aplicadas a la investigación para el cumplimiento de los objetivos planteados.

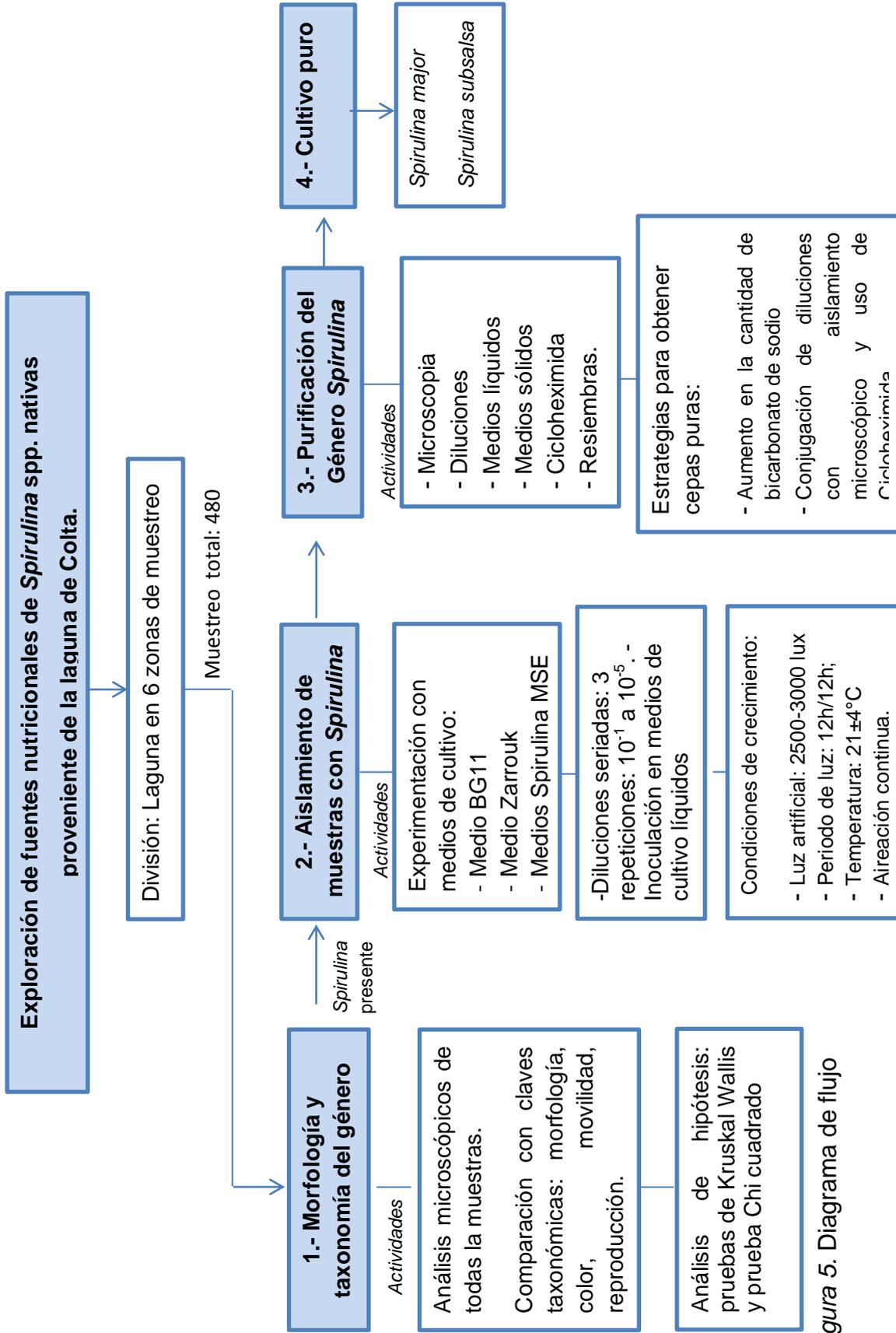


Figura 5. Diagrama de flujo

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Muestreo

- Población y muestra

La población determinada para el trabajo investigativo fue la Laguna de Colta. La superficie de la laguna que se ha intervenido fue 172 hectáreas aproximadamente (Jaramillo, 2015, p.3), con trabajos de dragado y extracción de totora- El área de la laguna se puede apreciar en la Figura 6.

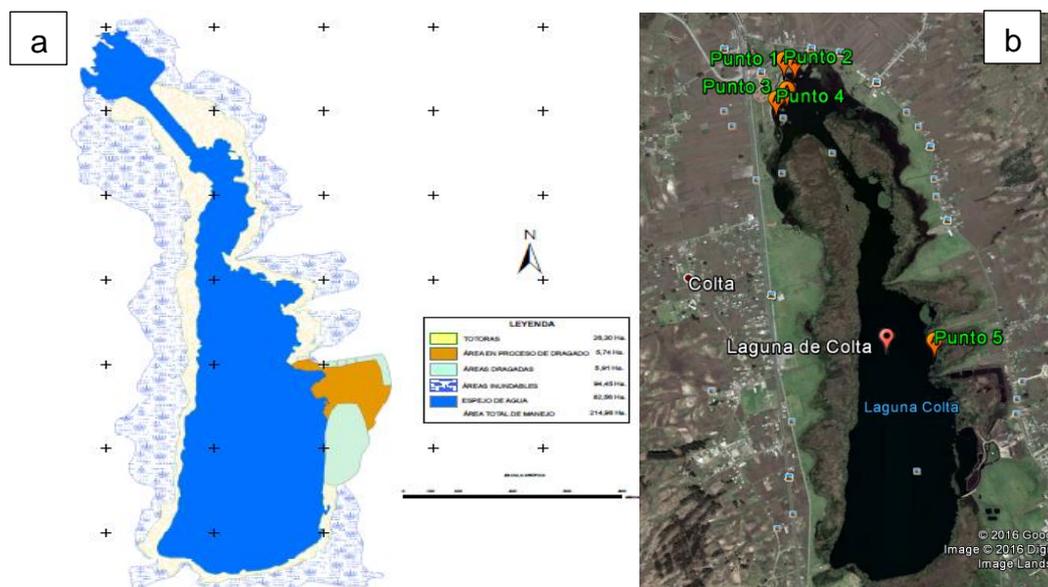


Figura 6. Área total de la Laguna de Colta

Tomado de (Municipio de Colta, 2013, p.1; Google Earth, 2016, p.1).

a) Mapa de áreas

b) Mapa por satélite

Para la determinación de la muestra probabilística se analizó 6 zonas según el tiempo de dragado en la Laguna. En cada zona se recolectó 20 muestras, en

la parte superficial del espejo de agua de la laguna con una profundidad de 20 cm.

- **Selección de zonas de muestreo**

Las áreas seleccionadas para ésta investigación se basaron según el tiempo de dragado en la Laguna. La Tabla 5 y en la Figura 9 muestran la posición gráfica de las áreas asignadas, que se analizará en el apartado de resultados y discusión.

En cada zona se recogió 20 muestras, la ubicación exacta fue obtenida por medio de GPS (WGS 84).

Se muestreo entre los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre, específicamente 4 fechas, las cuales se indican en cada zona. Obteniendo un total de 480 muestras de las 6 zonas.

Las muestras recolectadas fueron trasportadas de Riobamba a Quito, para ser analizadas. La metodología aplicada para el muestreo se modificó de los autores Cárdenas e Islas, 2015, p.194; Bonilla *et al*, 2009. Las muestras se tomaron en la parte superficial del espejo de agua a una profundidad de 20 cm, se recolectó 0,5 L en cada punto de muestreo. Se realizó de forma manual, realizando arrastres horizontales (Bonilla *et al*, 2009).

Cada recipiente plástico fue etiquetado y almacenado a temperatura ambiente hasta su posterior uso (Cárdenas e Islas, 2015, p.194) (Bonilla *et al*, 2009). Se mantuvo un registro fotográfico de cada zona donde se muestreó. Además, las diferentes plantas acuáticas donde se observó biopelículas y posterior se visualizó mediante microscopio.

4.2 Preparación de medios de cultivo

Se homogenizó las muestras de agua provenientes de la laguna después de cada muestreo y se utilizó como inóculo tanto el agua como la biomasa

presente. Se filtró la muestra con una malla de nylon, obteniendo biomasa (Vicente, Hoyos, Sánchez y Cambra, 2005, p17-21). Ésta biomasa representa el cóctel de microorganismos iniciales del muestreo. Se procedió a pesar e inocular los medios para el crecimiento de *Spirulina*. Durante el desarrollo de esta investigación se probó y modificó diferentes medios con el fin de obtener crecimiento: Medio Zarrouk, Medio BG11, Medio *Spirulina* MSE , Medio con Agua Filtrada autoclavada: MAF.

Se inició el análisis de cada muestra observando la presencia de biomasa verde. En microscopio se visulizó algas verdes, diatomeas, cianobacterias en colonia, filamentosas adheridas a un sustrato, materia orgánica, plantas acuáticas, elemntos abióticos, fragmentos de raices, etc. (Bonilla, 2009, pp.37-40). Como se puede apreciar en la Figura 20, se observa cúmulos de biomasa entre colores verde y negro, señalado con círculo blanco.

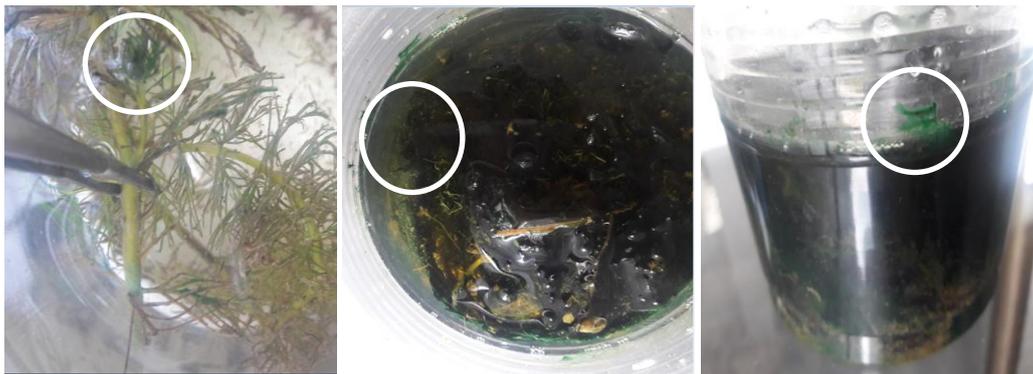


Figura 7. Muestras con biomasa verde inicial.

Nota: Señalado con circulo blanco

Se preparó soluciones madre acorde a los protocolos consultados y adaptados (Andersen, 2005; Rout *et al*, 2013). Se utilizó 2 medios definidos en el Libro Algal Culturing Techniques: Medio *Spirulina* MSE, Medio BG11, los cuales se modificaron (Andersen, 2005, pp.467, 435) y Medio Zarrouk (Raouf *et al*, 2006; Madkour *et al*, 2012). La composición de los medios se encuentra en el Anexo 1 y su formulación en el libro del autor Andersen citado en este párrafo.

- Medio con Agua Filtrada autoclavada proveniente de la Laguna de Colta: MAF

Se empleó agua filtrada autoclavada (AF) en su totalidad (100%), más solución de hierro como medio inicial. En la figura 8, se observa la biomasa verde filtrada y pesada, la cual fue utilizada como inóculo.



Figura 8. Biomasa verde.

- a) Medición de peso en balanza analítica.
b) Crecimiento de biomasa verde con agua filtrada

- Medio Spirulina MSE

El medio Spirulina MSE se compone de los siguientes reactivos: NaHCO_3 8g/L, NaCl 5g/L, KNO_3 2g/L, K_2HPO_4 0,5g/L, MgSO_4 0,2g/L, solución de hierro 5 gotas por litro (Bermúdez, 2016; Aiba and Ogawa 1977; Schlösser 1994; Culture Collection of Algae and Protozoa Catalogue of Strains, 1988). Para la eliminación de algas eucariotas en el medio de cultivo se añadió cicloheximida (Rout *et al*, 2013, p.66). La solución fue autoclavada a 121°C y a 104 kPa durante 15min. Se puede observar en formato tabla su composición en el anexo 2.

Para la experimentación con variación de porcentajes se empleó el procedimiento del autor Jiang con su grupo de trabajo, en el cual varían desde

0%, 25%,50%,75%, 100% (Jiang *et al*, 2015, p.305). Para este trabajo se plantearon cuatro variaciones en la composición del medio MSE, asignados con una sigla, como se aprecia en la Tabla 4:

Tabla 4.

Variación de porcentajes

N°	Sigla	Composición
1	M1	20% Agua laguna + 80% Medio <i>Spirulina</i>
2	M2	30% Agua Laguna + 70% Medio <i>Spirulina</i>
3	M3	50% Agua Laguna + 50% Medio <i>Spirulina</i>
4	M4	70% Agua Laguna + 30% Medio <i>Spirulina</i>

En el anexo 7, se muestran las 4 variaciones en una tabla la cual representa la intensidad del color en el transcurso del tiempo de inoculación.

La combinación con mayor intensidad de color verde y presencia de *Spirulina*, se preparó de la siguiente forma: 30% del volumen final correspondiente a agua filtrada de la laguna, el 70% restante correspondiente al medio de cultivo mencionado anteriormente. El agua de la laguna, fue esterilizada y filtrada para su uso.

Para la purificación, se modificó el medio aumentando la cantidad de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) a 16g/L, se mantuvo la cantidad de los otros reactivos NaCl 5g/L, KNO₃ 2g/L, K₂HPO₄ 0,5g/L, MgSO₄ 0,2g/L.

4.3 Aislamiento de cepas de *Spirulina*

Todas las muestras poseen elementos abióticos suspendidos, además de diversos microorganismos, en concordancia con el autor Rout *et al*, 2013, p.68, en una investigación similar.

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de agua homogenizada obteniendo por cada muestra, 3 repeticiones desde 10^{-1} a 10^{-5} , dependiendo de la concentración de la muestra las diluciones variaron. Se inoculó en los medios de prueba obteniendo mejor resultado cualitativo de visualización y presencia de *Spirulina* en el medio Spirulina MSE, con el cual se continuó con el aislamiento.

Se procedió a realizar cultivos mixtos en medio líquido, con el inóculo visto en microscopio y con presencia de *Spirulina* además de otras cianobacterias y algas, como se puede apreciar en la Figura 21. Se colocó el inóculo con el 30% de agua filtrada proveniente de la laguna y 70% de medio líquido. Dejando a temperatura ambiente con iluminación, período de 12 horas luz/12 horas oscuridad y aireación continua.

4.4 Determinación morfológica y taxonómica de *Spirulina* spp. mediante microscopía.

Las variedades de *Spirulina* spp. encontradas fueron identificadas en función a su morfología y su taxonomía. Mediante claves dicotómicas, se relacionó lo observado y se comparó con las características propias del género *Spirulina*.

Mediante un análisis microscópico de las muestras de agua y biomasa de color verde en las zonas asignadas dentro de la Laguna. Se observó la presencia de cianobacterias, se destacó el género *Spirulina* como objetivo principal de la investigación.

Posterior a la observación en microscopio en los diferentes aumentos (4x, 10x, 40x y 100x) y en conjunto con las características taxonómicas de estudios y claves dicotómicas se identificó 2 posibles especies del género *Spirulina* basadas en su caracterización morfológica según Ciferri, 1983, p.558; Rippka *et al*, 1979, Rout *et al*, 2013; Ballot, Dadheech y Krienitz, 2004.

4.5 Purificación de las cepas de *Spirulina* spp. a través de medios de cultivo sólidos y líquidos

Para la purificación de la cepa, se empleó el medio *Spirulina* MSE. Además, de la técnica de estriado por agotamiento de colonias que se encuentren en las cajas Petri con medios sólidos, con resiembras de las cepas (Cárdenas e Islas, 2015, p.195). Dejando a temperatura ambiente, con iluminación 12 horas luz /12 horas oscuridad y revisión cada 2 días.

En los medios líquidos se realizó traspasos a los 20-25 días con colonias en proceso de purificación. A temperatura ambiente, con iluminación 12 luz /12 oscuridad y aireación continua. Además, se realizó análisis microscópico cada dos días.

Se procedió a realizar cultivos mixtos debido a la cantidad de poblaciones de microalgas presentes, con el fin de poder identificar *Spirulina* en el cultivo. La biomasa obtenida se utilizó como inóculo formado por un cóctel de microalgas. En el Anexo 7 se muestra la variación de color en los 4 porcentajes de composición de medios. La biomasa obtenida del medio M2 fue sometida a múltiples lavados con agua filtrada autoclavada, para mantener las mismas condiciones del hábitat natural. Se puede observar este procedimiento en la Figura 9 y en mayor detalle en el Anexo 5.



Figura 9. Biomasa obtenida del medio M2, posterior a filtración.

- a) Biomasa inicial
- b) Inoculación de medio MSE con biomasa

Se planteó 3 pautas para convertir el medio Spirulina MSE, en un medio enriquecido y selectivo, que permita visualizar las especies de *Spirulina*:

- Cantidad de bicarbonato

En el proceso de purificación se aumentó la cantidad de bicarbonato al doble del inicial. El medio básico inicial fue con 8g/L de bicarbonato de sodio, posterior al crecimiento de biomasa en este medio, se empleó como inóculo para crecer en un medio modificado con 16g/L de bicarbonato de sodio. Tomado de Andersen, donde indica este aumento como una técnica de purificación (Andersen, 2005, p.226).

- Diluciones para siembra en platos Petri

Para obtener cultivos puros, el método más sencillo es iniciar en medio líquidos empleando diluciones. El inóculo que se emplea se utiliza para realizar diluciones seriadas con el cual se inocula tubos con medio, mientras mayor sea el número de repeticiones, la probabilidad de introducir un solo individuo puede aumentar (Stanier y Villanueva, 1996, pp. 20-21).

Posterior al crecimiento en líquido de un cultivo mixto, se inoculó medios sólidos con diluciones desde 10^{-1} a 10^{-5} . Se siguió su crecimiento tanto en cambio de color como en fotografías. Se realizó 3 repeticiones en medio sólido

en placas Petri por cada dilución. Con el fin de obtener colonias que puedan ser traspasadas y que conforme un solo género.

- Adición de cicloheximida

La cicloheximida se emplea por ser un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas en eucariotas. Su efecto se da en la interrupción de la formación de enlaces peptídicos, dado que se une a las subunidades de los ribosomas (Rincón y Chávez, 2006, p.49). El resultado obtenido es la detención del crecimiento celular provocando su muerte o la facilitación de la inducción de apoptosis por los receptores de muerte (Sigma, 2016, p.1).

Se empleó cicloheximida en el medio de cultivo, con el fin de inhibir algas eucariotas en el cultivo en una concentración de (50ug/ml, Sigma), sin afectar la presencia de la cianobacteria de interés (Rount *et al*, 2013, p.68). Se colocó como último paso en el medio de cultivo tanto en líquido como sólido.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Muestreo

- Selección de zonas de muestreo

El período de recolección en las zonas de muestreo fue de 3 meses: Septiembre, Octubre y Noviembre del año 2016. Se procedió a dividir la laguna en 6 partes como se mencionó anteriormente, además se puede observar en la Tabla 5 las coordenadas geográficas y en la Figura 10 una representación gráfica de las zonas en la Laguna.

Tabla 5.

Puntos de muestreo

Zonas	Tiempo de dragado (años)	Coordenadas Geográficas	
		Latitud	Longitud
1	6 años	S 01° 43,528'	W 0 78° 45,550'
2	7 meses	S 01° 43,550'	W 078° 45,590'
3	3 meses	S 01° 43,717'	W 078° 45,636'
4	5 meses	S 01° 43,903'	W 078° 45',588
5	9 meses	S 01°44,122'	W 078° 45,074'
6	2 años	S 01° 43,903'	W 078° 45',588'

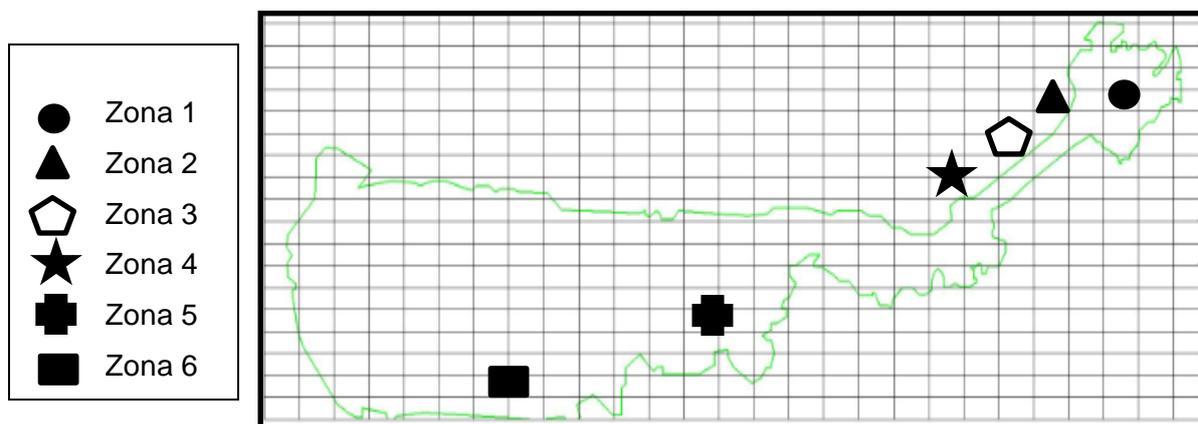


Figura 10. Sitios de muestreo en la Laguna de Colta, Chimborazo.

Se describe a continuación cada Zona con sus respectivas características:

- Zona 1

La Tabla 6, resume el tiempo correspondiente a esta zona posterior al dragado y características específicas de esta zona asignada.

Tabla 6.

Características de la Zona 1

Tiempo transcurrido desde el dragado	Profundidad	Presencia de <i>Spirulina</i>	Características
6 años	Orillas:30-60 cm Centro:100-150cm	Si	- Sedimentos compactados - Parte turística con embarcaciones - Ausencia de totora en las orillas - Eutrofización

La maquinaria de dragado no ha vuelto a ingresar en la Zona 1, lo que ha permitido lograr un equilibrio en la columna de agua. Como se ha mencionado anteriormente, el dragado puede ocasionar diversos cambios, entre estos se encuentra la química del agua. Este proceso artificial puede generar un aumento o disminución de nutrientes, trazas de metales pesados o modificación de niveles de salinidad, etc (Landaeta, 1995, p.4). Estos cambios, pueden beneficiar el crecimiento de *Spirulina*, dado que ésta cianobacteria crece en medios ricos en macro y micronutrientes, como el medio mencionado por Morais, Silva, Henrard y Vereira (2015, p.1936).

Se realizó 4 muestreos en el tiempo para todas las zonas, como se puede observar en la Tabla 7. Se analizaron las muestras mediante microscopía óptica. En la primera fecha de recolección se obtuvo como resultado 7 muestras (35%) con presencia de *Spirulina* de un total de 20 muestras, mientras que en la última fecha se obtuvo un aumento. Es decir, del 35% inicial de muestras con *Spirulina* se llegó al 60% en la última recolección. Este resultado está influido por el tiempo que ha tenido esta zona para estabilizarse y además la presencia de luz directa en partes de las orillas que influyen el

crecimiento de *Spirulina*, sin presencia de totora (Madkour, *et al*, 2012, p.52; Merida, Zepka y Jacob, 2013, p.11).

Tabla 7.

Fechas de recolección y porcentaje.

FECHA	Muestras con presencia de <i>Spirulina</i>	Porcentaje
04-Sep-2016	7	35%
10-Sep-2016	7	35%
09-Oct-2016	10	50%
13-Nov-2016	12	60%

La influencia de luz solar en esta zona 1, es una las más fuertes razones del porque existe mayor número de muestras de *Spirulina*.

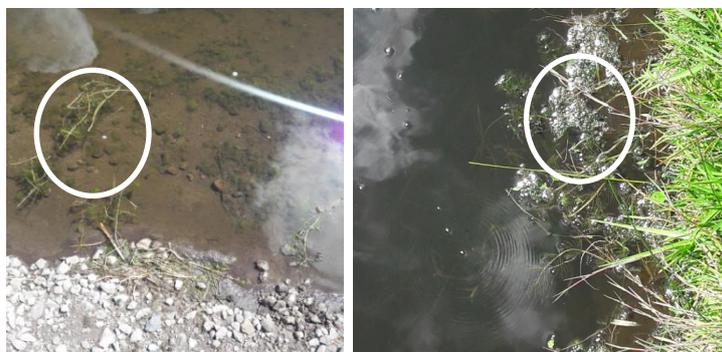


Figura 11. Zona 1: Biomasa verde en las orillas a poca profundidad,

Nota: Señalado con círculo blanco, la biomasa.

Las cianobacterias crecen de forma autotrófica, donde la luz solar es su principal fuente de energía. Experimentos en función a la disponibilidad de luz puede aumentar la comprensión acerca de la fisiología de cianobacterias ante variaciones externas y con diferentes intensidades de luz (Du, *et al.* 2016, p.119). En este caso, Zona 1, la tierra esta compacta, permitiendo que el agua se mantenga sin partículas en exceso que no permita el paso de luz.

Como se puede ver la figura 11, los cúmulos de biomasa verde se ubican en la interfaz agua-aire, también pegado como biofilms a plantas acuáticas y ramas presentes en la Laguna. La fotosíntesis que realizan las cianobacterias, sugiere basándose en datos ecológicos que se originó el linaje bajo presión selectiva de luz entre otros factores (Mulkidjanian *et al*, 2006, p.1326).

Del total de muestras analizadas por microscopia y dentro del género *Spirulina*, en el presente estudio se identificó *Spirulina subsalsa* y *Spirulina major*. Lo que indican los resultados, que al ser la zona más antigua dragada posiblemente los porcentajes mayores en comparación al resto de zonas se ve influenciado por el tiempo transcurrido sin otra intervención mecánica.

- Zona 2

La zona 2 se caracteriza por la presencia de totora, el dragado fue realizado hace 7 meses. En las muestras recolectadas, se encontró presencia de cianobacterias. Entre los factores que contribuye su desarrollo como lo indica Ponce, *Spirulina* puede crecer en medios adversos por su capacidad de absorber y almacenar nutrientes presentes, siendo entre las primeras en realizar fotosíntesis (Ponce, 2013, p.136).

La presencia de cianobacterias en ésta zona es constante, dado que en los tiempos de muestreos se obtuvo un porcentaje de presencia. En la Tabla 8, se resume características de la zona.

Tabla 8.

Características de la Zona 2

Tiempo transcurrido desde el dragado	Profundidad	Presencia de <i>Spirulina</i>	Características
7 meses	Orillas: 50 cm Centro:100cm	Si	- Sedimentos compactándose. - Zona contigua a la parte turística. - Presencia de totora en las orillas - Eutrófización

Se realizó 4 muestreos totales en 4 fechas distintas, como se observa en Tabla 9. Se analizó 20 muestras recolectas en cada fecha y mediante microscopia óptica se identificó la presencia de *Spirulina* en cada una.

Tabla 9.

Fechas de recolección y porcentaje de presencia

FECHA	Muestras con presencia de <i>Spirulina</i>	Porcentaje
04-sep-16	3	15%
10-sep-16	3	15%
09-oct-16	4	20%
13-nov-16	5	25%

La Zona 2 es una parte contigua a la Zona 1, se conectan por un brazo de la zona, se esperaría un resultado similar pero en poca proporción, como se observa en la Tabla 9. Posiblemente el movimiento que producen los barcos turísticos de la Laguna influyeron en la distribución de biomasa a través del

desplazamiento del cuerpo de agua. Además de influencia antrópica de movimiento de islotes móviles de totora entre zonas para una mejor presencia turística.



Figura 12. Zona 2: Presencia de totora y eutrofización.

Nota: Señalado con flecha en blanco.

En el caso de la Laguna de Colta, se puede observar en la figura 12, la presencia de un crecimiento excesivo de algas, lo que podría indicar niveles altos de Nitrógeno:Fósforo. En estudios relacionados, el fósforo es considerado como un factor limitante en el crecimiento de algas y microalgas, en especial en lagos y ríos con alta concentración de Nitrógeno y Fósforo (Lv, Wu, Chen, 2011, p. 54). Altas concentraciones de fósforo, nitrógeno, entre otros nutrientes, es el escenario para el desarrollo de eutrofización. Proceso en el cual, crecen de forma excesiva algas en masas de agua, llegando a alterar las características fisicoquímicas del cuerpo de agua (Camacho, 2001, p.20).

Pero la presencia de totora en partes de la laguna, cumple un rol en este nicho biológico que ha contribuido a tratar de mantener el equilibrio, dando paso al desarrollo de cianobacterias, entre la que destaca *Spirulina*.

La totora es una planta heliófita, adaptada a condiciones de inundación y saturación de humedad. Posee una parte aérea y otra debajo del nivel del agua. Cumple el papel de filtro, contribuyendo en el proceso de separar partículas; asimilación de nutrientes que pueden estar en exceso y retirarlo del medio para incorporarlos dentro. Soporte para el desarrollo de microorganismos en biopelículas (Delgadillo, *et al.*, 2010, pp. 21-22).

- Zona 3

La zona 3 corresponde a la más reciente zona intervenida, fue dragada hace 3 meses. La Tabla 10 resume sus características:

Tabla 10.

Características de la Zona 3

Tiempo transcurrido desde el dragado	Profundidad	Presencia de <i>Spirulina</i>	Características
3 meses	Orillas: 50 cm Centro: 100cm	No	- Sedimentos suspendidos - Maquinaria de dragado - Ausencia de totora en las orillas - Eutrofización

Nota: Presencia de otras cianobacterias en su mayoría *Oscillatorias, Anabaena*.

Dado el tiempo corto transcurrido desde el dragado, durante las fechas de recolección no se obtuvo presencia de *Spirulina*. La zona 3 se caracteriza por poseer presencia de otro género de cianobacterias que colonizan la mayor cantidad de área alrededor de la orilla. Además, como lo menciona Zeglin as comunidades microbianas lénticas pueden ser muy sensibles a los cambios ambientales, dependiendo de su intensidad (Zeglin, 2015, p.6).

Se realizó 4 muestreos totales en 4 fechas distintas, como se observa en Tabla 11. Se analizó 20 muestras recolectas en cada fecha, mediante microscopia óptica.

Tabla 11.

Fechas de recolección y porcentaje de presencia

FECHA	Muestras con presencia de <i>Spirulina</i>	Porcentaje
04-sep-16	0	0%
10-sep-16	0	0%
09-oct-16	0	0%
13-nov-16	0	0%

Esta zona se caracteriza por la presencia de eutrofización, maquinaria de dragado como se observa en la Figura 13 y ausencia de totora en la orilla.

En masas de agua naturales, uno de los problemas actuales es la eutrofización. Se denomina al aumento de nutrientes, en especial fósforo y nitrógeno que conduce al desarrollo acelerado de algas como especies vegetales en el agua (Haro y Perales, 2015, p.15). Un tratamiento terciario, se considera el cultivo de microalgas para el caso de aguas residuales (Haro y Perales, 2015, p.16).



Figura 13. Zona 3: Presencia de maquinaria de dragado y eutrofización en el espejo de agua

Spirulina es considerada una microalga, pero esta zona en el análisis microscópico no se encontró su presencia aunque en bibliografía se considera su uso para equilibrar el aumento de nutrientes. Uno de los factores que influyen en su ausencia, es el dragado. Como lo indican Erftemeijer, Riegl, Hoeksema y Todd, el dragado puede producir atenuación de luz dada las altas concentraciones de sedimentos suspendidos en un cuerpo de agua (2012, p. 1738); (Munro, 2010, p.143). La primera fecha de recolección se relaciona al primer mes en que se inició los procesos de dragado, por lo que esta característica de mayor sedimento y atenuación de luz es más notoria en esta zona 3. La luz tiene una relación directa y su disponibilidad influye en la producción de biomasa (Huarachi-Olivera, *et al*, 2015, p.3).

- Zona 4

El segundo dragado más reciente, pertenece a la Zona 4. El área se caracteriza por presencia de titora y eutrofización en las orillas de forma inicial. En dos fechas se observó presencia de *Spirulina* en las muestras recolectadas.

Tabla 12.

Características de la Zona 4

Tiempo transcurrido desde el dragado	Profundidad	Presencia de <i>Spirulina</i>	Características
5 meses	Orillas: 60 cm Centro: 100cm	Si	- Sedimentos suspendidos - Presencia de titora en las orillas - Eutrofización

Se procedió a muestrear en 4 ocasiones siendo en la última fecha de recolección, donde se encontró un mayor número de presencia de *Spirulina* en comparación a muestras anteriores, como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13.

Fechas de recolección y porcentaje de presencia

FECHA	Muestras con presencia de <i>Spirulina</i>	Porcentaje
04-sep-16	0	0%
10-sep-16	0	0%
09-oct-16	3	15%
13-nov-16	4	20%

La totora se ubica en las orillas de esta zona, basándose en bibliografía una solución biotecnológica para el tratamiento de aguas es el establecimiento de humedales, los cuales actúan como filtros naturales, se los construye con plantas que abundan en la zona: camolotes, totoras, etc. (Frers, 2008, p. 302). El papel de la totora en esta área como el área 2 permite equilibrar de forma biológica las elevadas concentraciones de N y P, dado que cuando se presenta una eutrofización se debe por un aumento de nutrientes en el cuerpo de agua (Delgadillo *et al*, 2010, pp. 21-22).

- Zona 5

Esta zona se ubica en la parte posterior de la laguna, como se observa en la Figura 10, se encuentra alejada de las zonas 1, 2, 3 y 4. Se diferencia del resto de zonas por su poca presencia de cianobacterias, en específico de *Spirulina*. En la Tabla 14, se observa el tiempo de dragado y las características de esta zona.

Tabla 14.

Características de la Zona 5

Tiempo transcurrido desde el dragado	Profundidad	Presencia de <i>Spirulina</i>	Características
9 meses	Orillas: 40-60 cm Centro: 100cm	Si	- Sedimentos compactándose - Ausencia de totora en las orillas - Eutrofización

Se procedió a muestrear en 4 ocasiones, como se resume en la Tabla 15. En las dos primeras fechas no hubo resultado de presencia de *Spirulina*, Las dos últimas fecha de recolección, se encontró 2 muestras con presencia de *Spirulina*.

Tabla 15.

Fechas de recolección y porcentaje de presencia

FECHA	Muestras con presencia de <i>Spirulina</i>	Porcentaje
04-sep-16	0	0%
10-sep-16	0	0%
09-oct-16	1	5%
13-nov-16	1	5%

En presencia de eutrofización, como en apartados anteriores se da el aumento de nutrientes especialmente de N y P, se puede apreciar de forma visula en la Figura 14, en l azona 5 la acumulación de biomasa en la orilla.



Figura 14. Zona 5. Biomasa verde natural en las orillas de la zona.

- Zona 6

La Zona 6 fue dragada hace aproximadamente 2 años. La tabla 16 resume, características específicas de esta zona.

Tabla 16.

Características de la Zona 6.

Tiempo transcurrido desde el dragado	Profundidad	Presencia de <i>Spirulina</i>	Características
2 años	Orillas: 50-60 cm Centro: 100cm	Si	- Sedimentos compactos - Presencia de totora en el centro - Eutrofización

Se recolectó en 4 fechas distintas, 20 muestras por fecha. En cada muestra hubo presencia de *Spirulina*, en menor o mayor proporción, como se observa en la Tabla 17.

Tabla 17.

Fechas de recolección y porcentaje de presencia

FECHA	Muestras con presencia de <i>Spirulina</i>	Porcentaje
04-sep-16	1	5%
10-sep-16	1	5%
09-oct-16	2	10%
13-nov-16	4	20%

Resultado comparativo entre las 6 zonas

La figura 15 representa una comparación entre las 6 zonas, la cantidad de muestras con presencia de *Spirulina* se ubican de color verde, destacándose la Zona 1 con 36 muestras. El mayor contraste en la figura se refleja en la ausencia de columna en la zona 3. Esta Figura muestras un resumen de las 6 zonas con *Spirulina*.

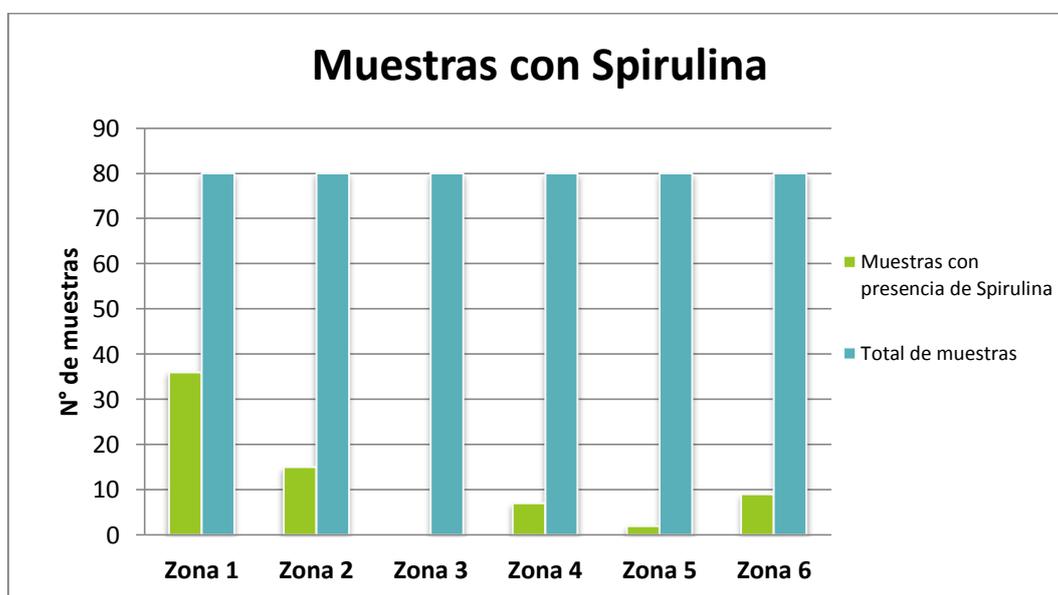


Figura 15. Muestras con presencia de *Spirulina*: N° de muestras vs Zonas

Nota: Zona 1 con 36 muestras, Zona 2 con 15 muestras, Zona 3 con 0 muestras, Zona 4 con 7 muestras, Zona 5 con 2 muestras, Zona 6 con 9 muestras.

El eje vertical de la Figura 15, está representado por columnas de color azul que indican el total de muestras por las 6 zonas en las 4 fechas (20 muestras cada fecha), es decir 80 muestras total por zona. Siendo el color verde las muestras con presencia de *Spirulina*. El eje horizontal son las 6 zonas en las cuales se dividió la Laguna.

El total de muestras obtenido fue 480, de las cuales en 69 muestras (14,38%), se identificó en estado natural dos especies del Género *Spirulina* como se puede observar en las figuras 23 y 25. Como en investigaciones anteriores, las muestras recogidas contenían residuos abióticos sólidos y poblaciones unicelulares además de cianobacterias filamentosas (Rout *et al*, 2013, p.68).

La identificación en ambientes naturales de las especies *Spirulina major* como de *Spirulina subsalsa*, se corrobora mediante diversas investigaciones. En México, un equipo de exploración aisló e identificó diferentes especies nativas de un río, lago y otros zonas asignadas (Rout *et al*, 2013). En otro caso, en cambio las muestras analizadas fueron colectadas de rocas, regiones de estuarios, etc. donde se evaluó la abundancia de algas azul-verdosas y cianobacterias (Nagle, Mhalsekar, y Jagtap, 2010, p.212).

En la actualidad se conoce, que las cianobacterias pueden encontrarse en todo tipo de hábitat y biomas, pero el éxito de su colonización se da en la capacidad de adaptabilidad al ambiente (Büdel, 2011, p.11). Como es el caso del presente estudio, la laguna fue intervenida de forma mecánica (dragada), actúa como un factor externo que posiblemente alteró el equilibrio ecológico, en el cual *Spirulina* logró adaptarse y desarrollarse.

5.2 Determinación de medios de cultivo

Como se indicó anteriormente se empleó diversos medios para el crecimiento de ésta cianobacteria, de los cuales 2 medios se encuentran definidos en el Libro *Algal Culturing Techniques: Medio Spirulina MSE*, Medio BG11, los cuales se modificaron (Andersen, 2005, pp.467, 435) y medio Zarrouk.

El resultado obtenido fue que el Medio Zarrouk, Medio *Spirulina* y Medio BG11 (Andersen, 2005, p.67), no se obtuvieron resultados favorables en crecimiento. En el análisis microscópico se observó un aumento de *Oscillatorias*, algas unicelulares desplazando a *Spirulina*.

Por lo que se concluyó el uso de un medio modificado, en el cual se obtuvo crecimiento en el Medio *Spirulina* MSE M2 tanto en líquido como en sólido, a pesar de no usar un inóculo puro de una sola especie de *Spirulina*, se visualizó un mayor desarrollo de filamentos de *Spirulina* en contraste a las otras cianobacterias, en la misma muestra, creciendo a los 20-25 días.

- **Medio con Agua filtrada autoclavada, proveniente de la Laguna de Colta: MAF**

El crecimiento de *Spirulina* en agua filtrada excedió el tiempo estimado de crecimiento en bibliografía, apareciendo la multiplicación de los primeros filamentos a los 65 días. Como se puede observar en la Figura 16.

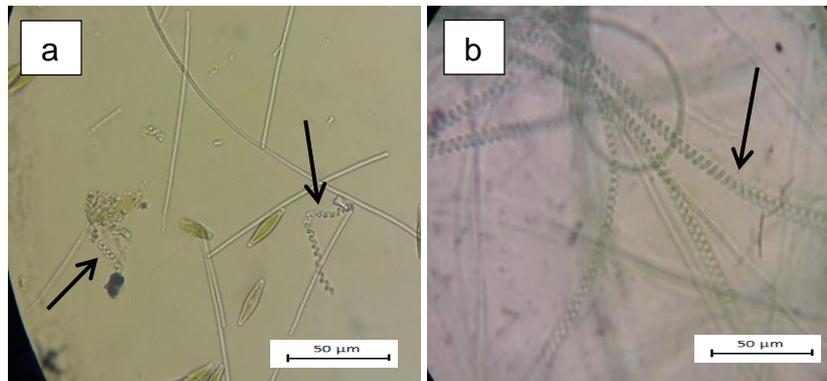


Figura 16. Análisis microscópico de *Spirulina* en crecimiento en MAF.

a) y b) *Spirulina* señalada con flecha negra.

Nota: Contaminantes posibles: *Navícula*, *Oscillatoria* en ambas fotografías.

Basándose en bibliografía, para el crecimiento de microalgas, en excepcionales ocasiones es totalmente aceptable el uso de agua del mismo sitio. El rendimiento en crecimiento es bajo para poder mantenerlo en cultivo o laboratorio, se necesita la adición de nutrientes adicionales como de metales traza (Andersen, 2005, p.31). Lo que concuerda con el tiempo de 65 días obtenido en esta investigación al solo emplear agua de la Laguna, en comparación a otras investigaciones con tiempos menores de crecimiento.

En el año 2015 el autor Affan con su grupo de investigación, evalúan la variación de la biomasa de *Spirulina maxima*, probando 33 medios diferentes, variando la profundidad y luz superficial. El medio enriquecido con urea fue en el que se obtuvo mejores resultados, inoculado con 0,015g/L y el crecimiento en 16 días (Affan *et al*, 2015, p.993). Zhang describe en la curva de crecimiento para *S. subsalsa* el inicio de la fase estacionaria al día 21 y la fase de muerte a los 29 días.

Se realizó adicionalmente cajas Petri, para comprobación en medio sólido agua filtrada y Bacto Agar. Se observó contaminación con otras cianobacterias, siendo el género *Oscillatoria* el predominante.

- **Medio denominado “*Spirulina*” enriquecido: MSE**

Se procedió a formar un medio enriquecido: agua de la laguna filtrada (AF) más medio *Spirulina*, se especifica los componentes del medio en el Anexo 2.

Se empleó un medio enriquecido al existir un microorganismo que se encuentra presente en pequeña cantidad, en especial si existen otros microorganismos en mayor proporción. Suele ser líquido y aporta nutrientes en conjunto de condiciones ambientales acopladas para el desarrollo del microorganismo en particular (Tortora, Funke, Case, 2007, p.172). En este caso, *Spirulina* se encuentra en muy poca proporción en relación a las otras cianobacterias y algas.

El medio de cultivo se formó con la variación de porcentajes (v/v), como se muestra en el Anexo 7. La variación de porcentajes permite obtener una proporción en la cual el microorganismo de interés se desarrolló en menor tiempo (Jiang *et al*, 2015, p.305).

La formulación de las 4 variaciones se puede observar en el apartado 4.2, correspondientes a Procedimientos. A continuación se detalla los resultados obtenidos: la muestra M1 al décimo día de inoculación se observó un cambio de color en el medio, lo que visualmente permitió ver el crecimiento de cianobacterias entre otros microorganismos, cambiando el color de transparente a un color verde. En la muestra M2 al segundo día de inoculación con biomasa verde como se explica en el final del apartado 4.2.3 Medio Spirulina MSE, fue en el que se observó un crecimiento más rápido de cianobacterias en conjunto con otros microorganismos. En la muestra M3, al octavo día de inoculación se observó crecimiento. Finalmente la muestra M4 al día doce de inoculación. En la Figura 17 se observa la diferencia de color entre 3 de las 4 muestras.

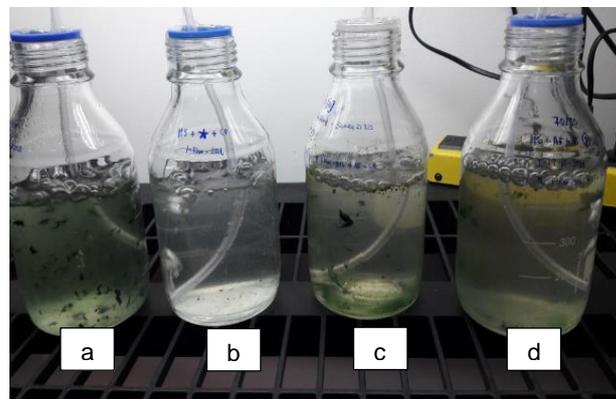


Figura 17. Variación de coloración entre los 4 de medios, al décimo día

- a) M2: 30/70
- b) M1: 20/80
- c) M3: 50/50
- d) M4: 70/30

El autor Jiang con su grupo de trabajo, investigaron el empleo de agua residual procedente de una fábrica de glutamato monosódico para el cultivo de *S. subsalsa*. El medio de cultivo empleado fue la mezcla de medio Zarrouk y agua

de la fábrica en proporciones de 0%, 25%,50%,75%, 100%. Siendo el 25% de agua residual con glutamato y 75% medio Zarrouk, adecuado para la producción de proteína (Jiang *et al*, 2015, p.305). Esta investigación permitió dar una pauta para el presente trabajo en modificar el medio con el fin de que el microorganismo de interés pueda adaptarse y lograr purificar cepas. La mezcla con mejor resultado fue 30% AF + 70%MSE en medio sólido. Para la formulación del medio se siguió los pasos de Aiba y Ogawa 1977, Schlösser 1994.

- **Medición de pH**

El pH básico inicial favore a una mejor adaptación de la cepa para un desarrollo rápido y productivo como lo indica Rodríguez y Serrano, 2006. A medida que el pH aumenta, es indicativo que la *Spirulina* se está desarrollando llegando incluso a pH 10 u 11 (Ramírez-Moreno *et al*, 2006, p.7) como se muestra en la Figura 18, a los 11 días se produjo un aumento a un pH de 9,97.

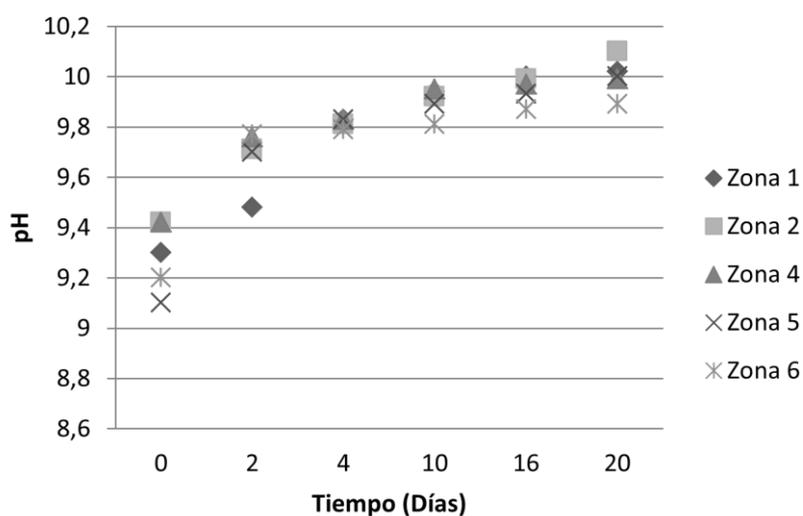


Figura 18. Medición de pH de las muestras incubadas con biomasa de *Spirulina*.

El pH aumenta a medida que se libera OH en el medio de cultivo, eso se genera al aumento gradual de bicarbonato. Se realizó un seguimiento de tiempo a medida que el pH aumentada en el transcurso de días en los medios

con biomasa de cada zona. El aumento de pH cumple el papel de autoinhibidor de crecimiento celular (Pandey, Pathak y Tiwari, 2010, p.2). El pH posee un efecto directo tanto en la disponibilidad de nutrientes como en la fisiología de microalgas (Morales, 2002, p.376). La cianobacteria *Spirulina* identificada en esta investigación con medio M2 inició en promedio un pH de 9,4 llegando a los 20 días a un pH máximo de 10,6.

La zona 3 no presentó crecimiento de *Spirulina*, por lo que no se consideró para la gráfica.

- **Condiciones de crecimiento**

Las condiciones de crecimiento que se emplearon durante la investigación fueron:

Tabla 18.

Condiciones de crecimiento en laboratorio

Condiciones	Unidades
Luz artificial	2500-3000 lux
Periodo de luz	12h oscuridad/12 h luz
Temperatura	21 ± 4 °C
Aireación	Continua

Las condiciones de cultivo establecidas se basaron en una revisión bibliográfica De Morais *et al*, 2007; Rout *et al*, 2013; periodo de luz 12/12 (Madkour *et al*, 2012; Raoof, Kaushik y Prasanna, 2006), como se observa en la tabla 18.

Se consideran la condiciones de cultivo, dado que se puede generar un efecto desfavorable cuando existe una elevada intensidad luminosa, ausencia de dióxido de carbono, sobresaturación de oxígeno. Puede producir fotooxidación, este fenómeno puede llegar a matar el cultivo, y se lo considera de mayor forma en cultivos masivos de *Spirulina* (Gallardo y Cobelas, 1989, p. 27).

5.3 Aislamiento de cepas de *Spirulina*

Como resultado obtenido, se concuerda con Rout que *Spirulina* se encontró en la parte superior de la masa flotante (Rout *et al*, 2013, p.68) y formando parte de biopelículas en tallos y puntas de las hojas de plantas acuáticas en conjunto con otras especies de cianobacterias en la que destaca *Nostoc*, *Spirogyra*, *Chlorella*, *Anabaena*, entre otras.

El medio formulado MSE M2 con variación de porcentajes y adición de cicloheximida, corresponde a un medio selectivo de utilidad para aislar microorganismos que se encuentran en poblaciones microbianas mixtas. El resultado es la presencia de *Spirulina* en mayor cantidad que las otras cianobacterias tanto en medio líquido como sólido. (Apella y Araujo, 2005, p.38). La resiembra de una colonia a otra caja, permitió el crecimiento de *Spirulina* pero en poca cantidad, como se muestra en la Figura 19.

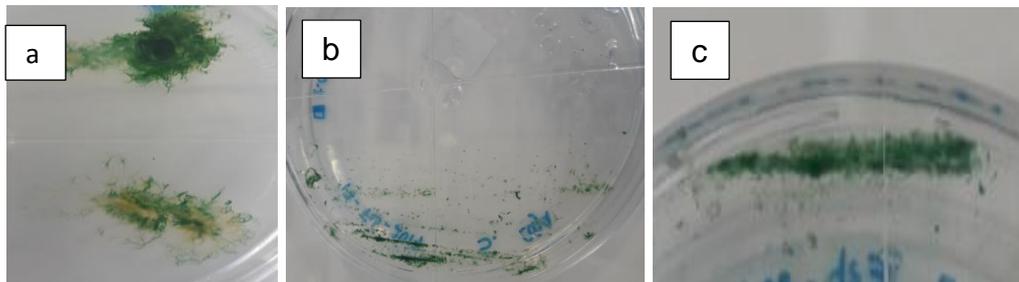


Figura 19. Traspaso de colonias mediante estriado por agotamiento

- a) Colonias con presencia de otras cianobacterias. Traspaso a b)
- b) Crecimiento de colonias. Traspaso a nueva caja c)
- c) Crecimiento a los 20 días del género *Spirulina*

Al observar por microscopio y verificar visualmente el aislamiento de *Spirulina*, como se muestra en la Figura 20. Se continuó con la identificación para poder comparar las características propias del género.

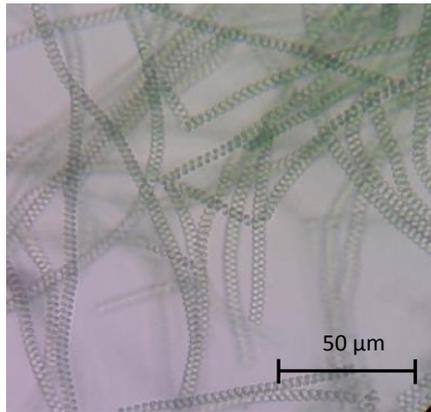


Figura 20. Vista microscópica de la la Figura 19 c) a 100x.

La Figura 21, es una breve recopilación de algunas de las cinaobaterias observadas, no corresponde a una evaluación exhaustiva ni específica por especies. Dado que los objetivos planteados correponde al aislamiento e identificación de *Spirulina* spp.

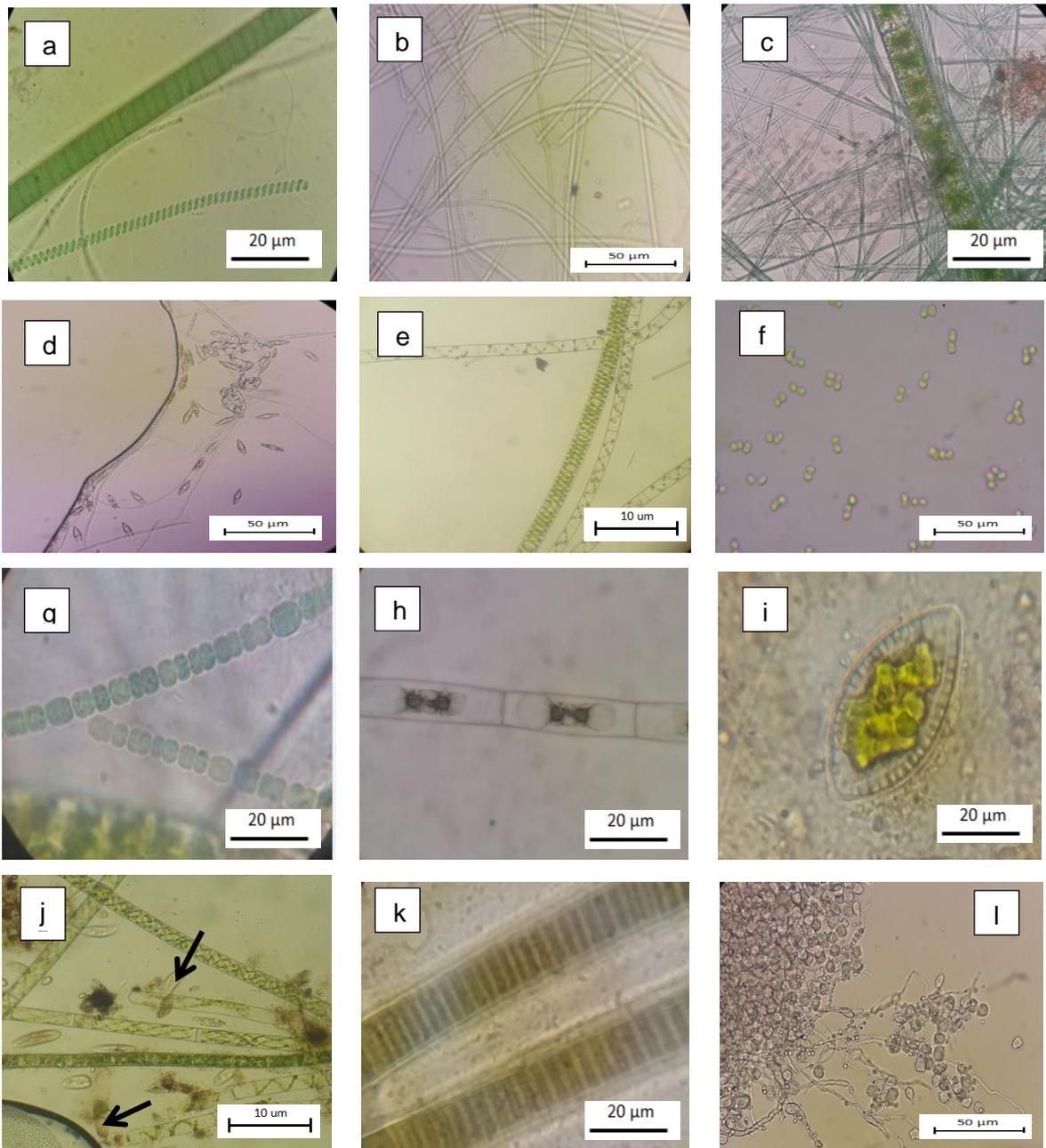


Figura 21. Cultivo mixto con especies encontradas. Posiblemente:

- a) *Oscillatoria* sp. y *Spirulina* sp.
- b) *Oscillatoria*
- c) *Zygnema*
- d) *Navícula*
- e) *Spyrogyra*
- f) *Chlorella*
- g) *Anabaena*
- h) *Zygnema* sp.
- i) Sin identificar
- j) *Euglena* señalado con flecha negra.
- k) *Oscillatoria* sp.
- l) Algas unicelulares

5.4 Determinación morfológica y taxonómica de *Spirulina* spp.

En la figura 22, se puede observar los filamentos de color azul-verdosos sin ramificaciones, también la forma helicoidal de los tricomas (Stanier y Villanueva, 1996, p.393). Además, ausencia de heterocistos en los filamentos (Rippka *et al*, 1979). La movilización vista bajo microscopio fue girando en su propio eje.

Dado que una de las características principales del género *Spirulina*, es su forma helicoidal además de lo descrito anteriormente se confirma que las cianobacterias vistas pertenecen a éste género (Ciferri, 1983, p.558). Una característica general entre las especies de éste género, es que en medios líquidos, *Spirulina* se mantiene en forma helicoidal mientras que en medios sólidos se puede observar su forma espiral (Ciferri, 1983, p.558).

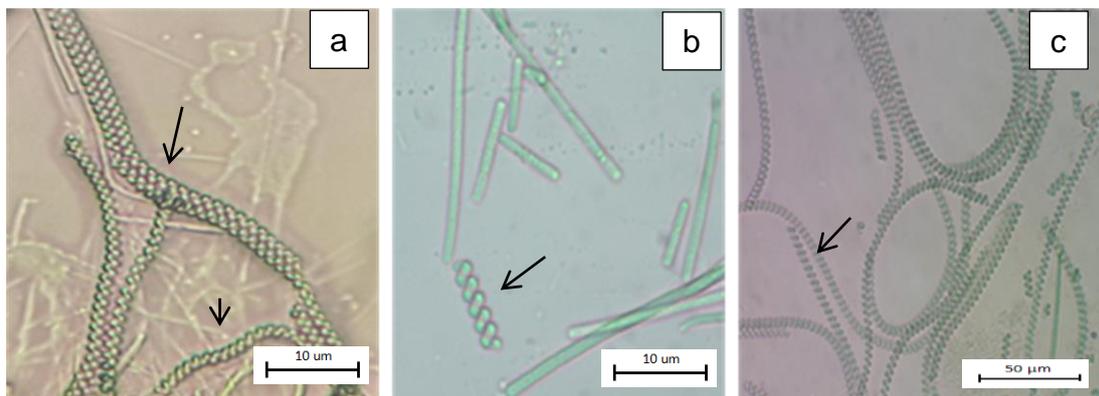


Figura 22. Forma helicoidal de las especies vista en microscopio óptico, señalado con flecha

- a) en 100x
- b) en 100x
- c) en 40x.

5.4.1 Especie *Spirulina subsalsa*

Acorde a investigaciones de identificación y en base a características morfológicas, se pudo identificar *Spirulina subsalsa*, como se puede observar en la Figura 23. Las características observadas corresponden a lo descrito por Ballot, Dadheech y Krienitz, (2004); Hargraves y Víquez (1980). Los septos no son visibles al microscopio, ausencia de caliptra (capucha membranosa) en la parte final del filamento. No posee vesículas de gas, forma helicoidal. En relación a la forma de los extremos como de la morfología de la última célula de la hélice, presentan extremos redondeados (Ballot, Dadheech y Krienitz, 2004, p.134); (Pineda-Mendoza, Martínez-Jerónimo, Garduño-Solórzano y Olvera-Ramírez, 2011, p.41).

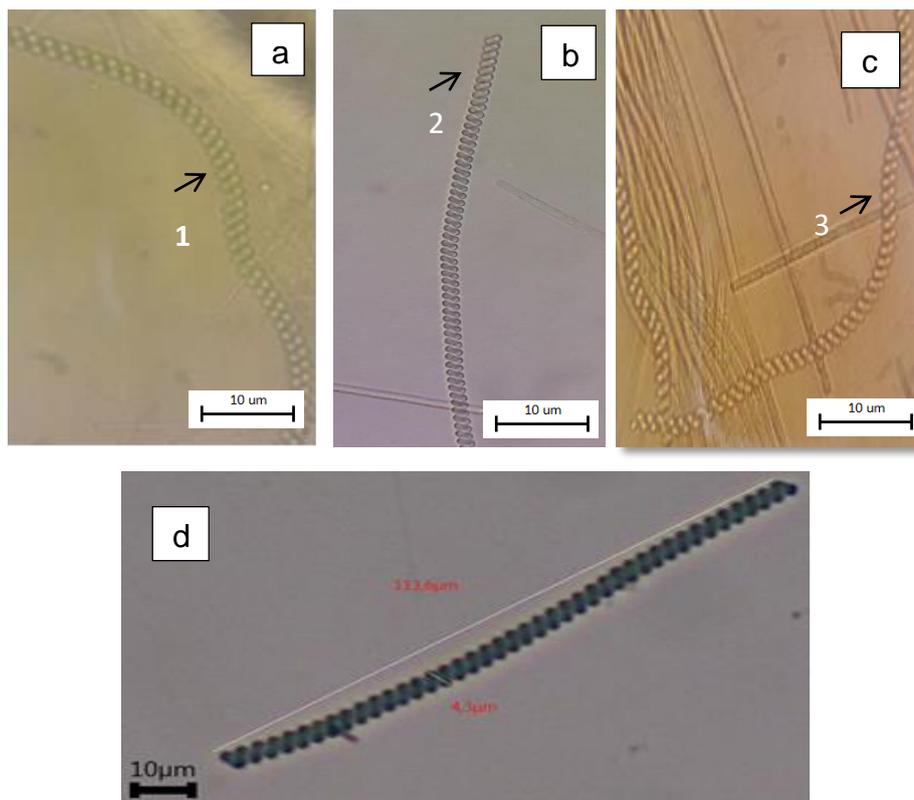


Figura 23. *Spirulina subsalsa*.

- a) Forma helicoidal vista en 40x
- b) Extremo redondeado de la hélice.
- c) Ausencia de septos
- d) Número en rojos representan: Diámetro del filamento: 4,3 µm; Longitud del filamento: 113,6 µm.

Nota: Se utilizó Microscopio óptico (BOECO) en conjunto con el Software Toup View versión x64.

Spirulina subsalsa ha sido identificada en el año 2013 en una investigación de aislamiento y preservación de germoplasma de *Spirulina* (Rout *et al*, 2013). En el año 1892 fue descrita y clasificada en Gomont, en la Figura 24 se compara mediante fotografías entre *Spirulina subsalsa* identificada por claves dicotómicas de esta investigación y las imágenes del año 2013 y 1892, respectivamente.

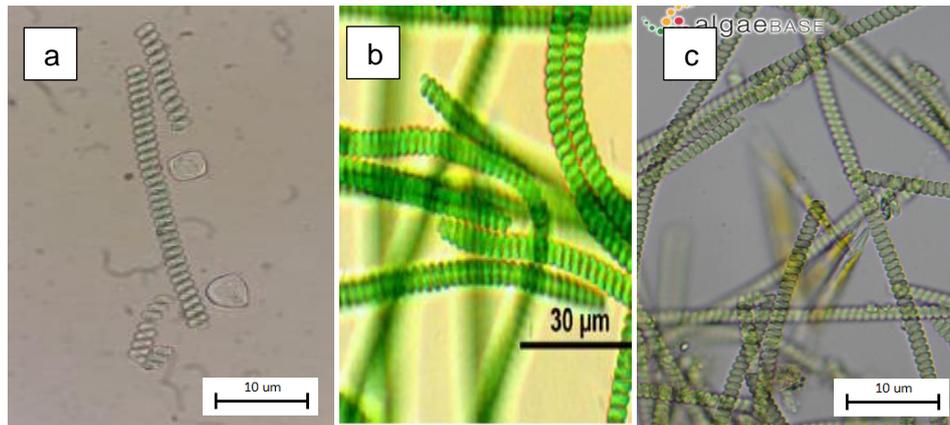


Figura 24. Comparación de 2 investigaciones que han identificado *Spirulina subsalsa*, con la identificada en la investigación.

- a) *Spirulina subsalsa* proveniente de la Laguna de Colta en 40x
- b) *Spirulina subsalsa* identificada en Rout *et al*, 2013.
- c) *Spirulina subsalsa* Oersted ex Gomont en 1892. Tomado de Alga Base.

5.4.2 Especie *Spirulina major*

En la Figura 25 se puede analizar algunas características correspondientes a esta especie. El color de los tricomas varía entre verde azul brillante u opaco (. Generalmente se los encuentra en solitario, es decir no aglomerados con más filamentos de la misma especie. Se los puede observar de forma regular enroscados. La hélice no es estrecha, por lo que se puede visualizar las paredes cruzadas. Diámetro de la hélice varía ente 1-2 μm de ancho. Los extremos de la hélice poseen forma redondeada en sus células terminales como lo describen Stancheva, Sheath, Kociolek, Fetscher y Fuller, 2012; Rout *et al*, 2013, p.69.

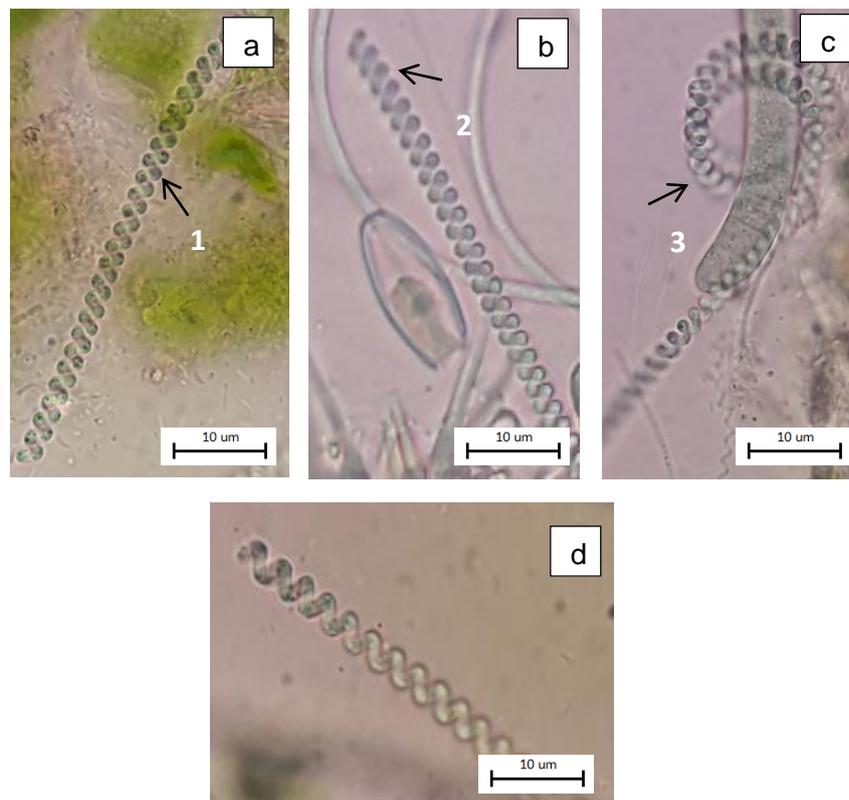


Figura 25. *Spirulina major*.

- a) 1. Hélice no estrechamente junta en 100x.
- b) 2. Extremo de la hélice en forma redondeada en 100x
- c) 3. Posición enroscada, vista en 100x
- d) Filamento visto en 100x

Nota: Se utilizó Microscopio óptico (BOECO) en conjunto con el Software Toup View versión x64.

Spirulina major ha sido identificada en el año 2013 en una investigación de aislamiento y preservación de germoplasma de *Spirulina* (Rout *et al*, 2013). Como en la anterior especie identificada. En el año 1892 fue descrita y clasificada en Gomont, en la Figura 26 se compara mediante fotografías entre *Spirulina subsalsa* identificada por claves dicotómicas de esta investigación y las imágenes del año 2013 y 1892, respectivamente.

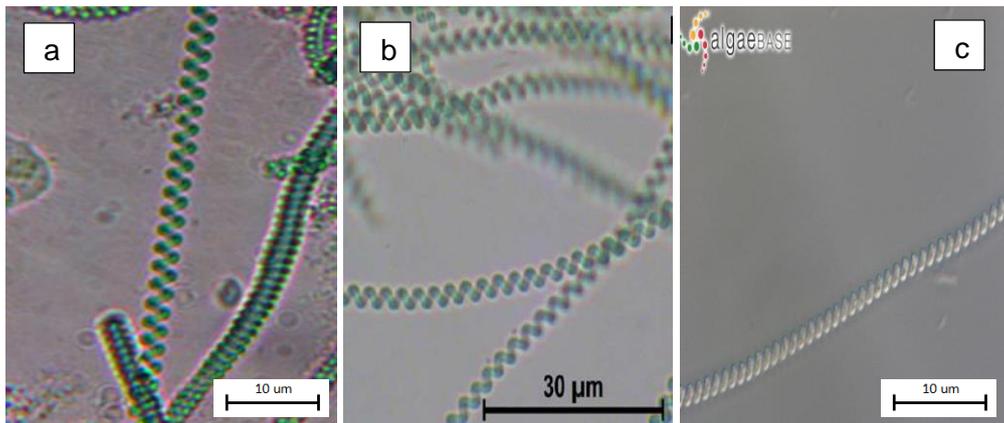


Figura.26. Comparación con 2 investigaciones que han identificado *Spirulina major*.

- a) *Spirulina major* proveniente de la Laguna de Colta en 100x
- b) *Spirulina major* identificada en (Rout *et al*, 2013)
- c) *Spirulina major* Oersted ex Gomont. Tomado de Alga Base.

5.5 Purificación de las cepas de *Spirulina*

Las cianobacterias pueden habitar en poblaciones mixtas con otros microorganismos. La selección de medios líquidos de enriquecimiento posee como objetivo restringir el espectro de microorganismos presentes, pero existe la probabilidad que unos crezcan más rápido y predominen en el cultivo (Rippka, 1988, p.212). Como lo sucedido en este trabajo, posterior al uso de 100% agua filtrada, se observó mediante microscopia la presencia de otras cianobacterias. Se procedió a enriquecer el medio para formularlo a las necesidades de *Spirulina* combinado con el medio establecido de *Spirulina* en Andersen. El autor Rippka indica que, para realizar un aislado es preferible realizarlo de forma directa en las acumulaciones naturales.

Para la purificación de las cepas de cianobacterias con el género *Spirulina*, se realizaron 3 principales pasos, que se describen en los apartados siguientes:

- **Cantidad de bicarbonato de sodio**

Una característica del cultivo de *Spirulina* es que su crecimiento se da en altas concentraciones de bicarbonato y pH alto (Andersen, 2005, p.226). La contaminación de cultivos de *Spirulina* puede disminuir manteniendo concentraciones de 0,2 M bicarbonato de sodio, así como un pH encima de 10 y densidades celulares altas (Richmond, Karg y Boussiba, 1982, p.55)

El bicarbonato de sodio no solo cumple el rol de fuente de carbono, también mantiene las condiciones alcalinas, las cuales son favorables para el crecimiento de la *Spirulina* (Raouf, Kaushik y Prasanna, 2006, p.540). La Laguna de Colta posee un pH alcalino entre un rango de 9, por lo que concuerda con el desarrollo de *Spirulina* entre sus poblaciones de cianobacterias.

En la Figura 27 a) se observa medio sólido MSE con 8g/L, en análisis microscópico se visualizó filamentos de *Spirulina* pero en conjunto con posiblemente *Oscillatoria* y *Navículas*, biomasa de color amarillo y verde, a

medida que disminuye los nutrientes o el dióxido de carbono, puede generarse un proceso de fotooxidación (Gallardo y Cobelas, 1989, p. 27). En la Figura 27 b) se encuentra medio sólido con 8g/L, donde se puede observar colonias expandidas en el borde de la caja Petri. En c), se realizó una resiembra con la ayuda de un asa de siembra metálica a una nueva caja, así como el corte de biomasa identificada con mayor número de filamentos de *Spirulina*.

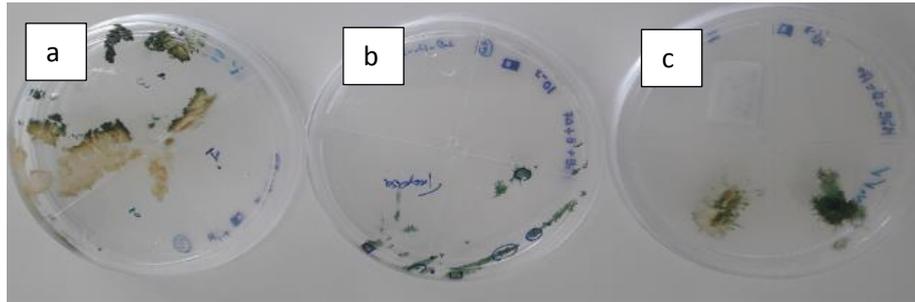


Figura 27. Traspasos. Colonia en proceso de aislamiento y purificación

a) Dilución 10^{-1}

b) Dilución 10^{-3}

c) Dilución 10^{-3}

Finalmente, se realizó una nueva resiembra, con técnica de estriado por agotamiento para visualizar colonias aisladas. La figura 28 a) muestra colonias del género *Spirulina*, para confirmar su presencia se observó a través de microscopio: *Spirulina subsalsa* y *Spirulina major* como se muestra en Figura 28 b).

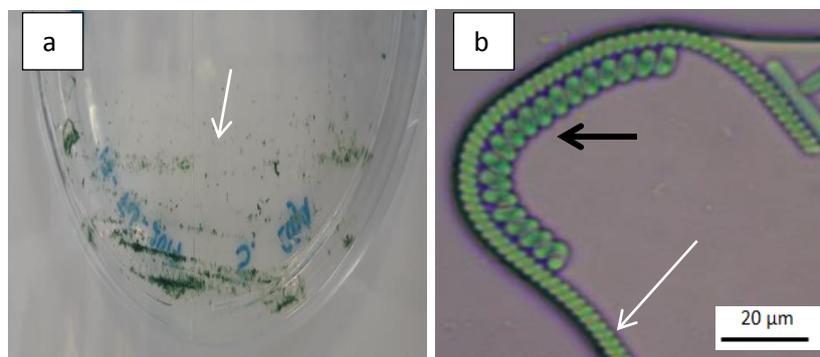


Figura 28. Visualización en caja y en microscopio de colonias aisladas.

a) Colonias aisladas con cianobacterias del género *Spirulina*. b) Análisis microscópico. *Spirulina subsalsa* señalada con flecha blanca y *Spirulina major* señalada con flecha negra

- **Diluciones para siembra en platos Petri**

En el presente trabajo se realizó diluciones del 10^{-1} hasta 10^{-5} , examinando cada una mediante microscopia. Dando resultado la mayor presencia de *Spirulina* en relación a las otras cianobacterias en 10^{-3} , tanto en líquido como en sólido.

Se obtuvo como resultado el crecimiento visible de colonias en 10^{-3} . En continuación, se procedió a sembrar en medio sólido con técnicas de siembra por extensión como por agotamiento (estriado). La siembra de cultivos en medio sólido de forma continua, permite que la dilución siguiente propague la separación de colonias que puedan multiplicarse. De esta forma se toma como inóculo para seguir placa tras placa con el fin de que al observar en el cultivo células del mismo tipo (Needham, 2016, p.24).

Una desventaja de este método, es que se lo utiliza para aislar el microorganismo predominante de una población mixta, cuando el método de siembra en cajas Petri como las diluciones no generan los resultados deseados, se recurre al aislamiento microscópicamente controlado o también conocido como de una sola célula (Stanier y Villanueva, 1996, p. 21).

Los resultados del aislamiento, se obtuvieron posterior a 6 meses de réplicas y diluciones seriadas, razón por la cual se concuerda con los autores el emplear un aislamiento microscópico. Observando cada cuadrante de las cajas con indicios de colonias pertenecientes al género *Spirulina*, para su posterior resiembra. Los autores Torrentera y Tacon recomiendan combinar la técnica de diluciones, siembra y transferencia a placas Petri con agar o a tubo inclinado, como se observa en la Figura 29. Además del uso de antibióticos para eliminar microorganismos contaminantes en el cultivo (Torrentera y Tacon, 2000, p.3)



Figura 29. Colonia con las dos especies de *Spirulina* en tubo inclinado.

- a) Colonias en tubo de plástico.
- b) Colonia observada en estereoscópio a 40x

Una dificultad del aislamiento de una sola célula o aislamiento microscópico se relaciona con el tamaño del organismo, si es grande puede realizarse a mano y controlando la observación microscópica pero si el microorganismo es pequeño se puede emplear un micromanipulador aumentando la observación de 500 a 100X en microscopio (Stanier y Villanueva, 1996, p. 21).

La identificación de las dos especies de *Spirulina* que son el resultado de esta investigación, conviven juntas en la misma cepa. No se logró separar individualmente dado el tiempo de crecimiento prolongado y para lograr un aislamiento por especies es necesaria la utilización de un micromanipulador con el fin de purificar y analizar específicamente cada especie, como lo emplea Rout *et al*, 2013, p.67. La figura 30, pertenece a una caja Petri con solo la presencia del género *Spirulina*.

Otro factor influyente en este resultado, se relaciona con la densidad celular, para la obtención de cultivos puros se necesita una alta densidad para poder mantener un cultivo sin contaminación y que crezca (Andersen, 2005 p. 215). Además, el tiempo de crecimiento no permite aumentar la densidad alta que se necesita para inocular y mantener una sola especie por separado. Las especies nativas en la investigación realizada por Round, crecieron a los 10-15 días,

(Round *et al*, 2013, p.67). A los 14 días en la investigación realizada en Estados Unidos (Lee *et al*, 2014, p.10), mientras que las especies nativas de esta investigación crecieron a partir de los 20-25-30 días dependiendo la contaminación o dilución de su purificación.

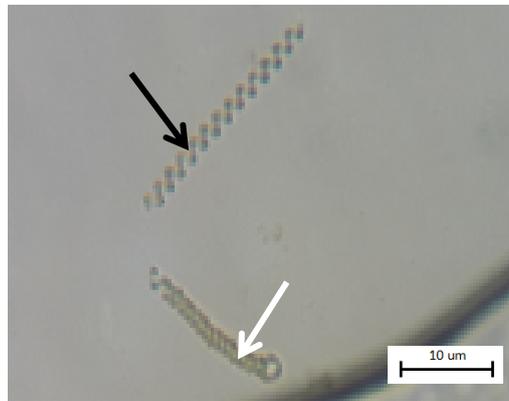


Figura 30. *Spirulina major* y *Spirulina subsalsa* en una colonia aislada.

Nota: *Spirulina major* con flecha blanca y *Spirulina subsalsa* con flecha negra.

Adición de cicloheximida

La utilización de este antibiótico es compartido por diversos autores (Pineda-Mendoza *et al*, 2011, p.34 ; Loza, 2011, p.42). Convirtiendo este medio en un medio selectivo por la presencia de cicloheximida y enriquecido por la mezcla con medio MSE y agua filtrada. Obteniendo como resultado el crecimiento de las especies del género *Spirulina*.

La contaminación común que se da en cultivos microalgas cuando se requiere obtener un cultivo monoespecífico es la presencia de protozoos, bacterias entre otras microalgas. Las fuentes posibles son el aire proveniente de la entrada (manguera), el medio de cultivo, el frasco y el cultivo inicial (Catalá, 2013, p.28). El autor Andersen indica que en el cultivo de *Spirulina* y *Dunaliella* no necesariamente se debe encontrar libre de contaminantes dado que su crecimiento se da en ambientes extremos, al escalar se puede ocupar un inóculo con una contaminación no significativa (Andersen, 2005, p.214) y puede ser que interactúen de alguna forma.

Una investigación relacionada al estudio de interacciones ecológicas entre bacterias-algas indica que algunas bacterias pueden jugar un papel en la promoción de crecimiento de algas y microalgas, en una interacción mutualista (Ramanan *et al*, 2016, p.18). Existe asociaciones simbióticas entre hongos con algunas cianobacterias, un líquen es un claro ejemplo (Curtis y Schnek, 2008, p.530). Otro ejemplo, es simbiosis con raíces de árboles de cicadáceas o con helechos pertenecientes al género *Azolla* (Cox, Banack, Murch, 2003, p.1) Además de una relación entre cianobacterias y nanoplacton sobre el intercambio de carbono y nitrógeno. Dada estas posibles funciones, se plantea un entendimiento de interacciones complejo, por lo que se requiere un estudio completo que permita conocer las funciones ecológicas de cada miembro de la cadena alimentaria acuática (Ramanan *et al*, 2016, p.18).

La cianobacteria *Spirulina* posee un valor nutricional que en la actualidad su potencial se basa en la producción artesanal escalando a objetivos comerciales ((Wan, Wu, y Kuča, 2016, p.570). El uso de cepas nativas del país, abre la posibilidad de investigaciones que propaguen el uso de especies adaptadas en el ambiente natural donde fueron aisladas. Para esto se debe completar estudios nutricionales y de viabilidad de crecimiento de estas especies.

Resultado de planteamiento de hipótesis

Se planteó 2 hipótesis en función de las variables de la investigación. Siendo un paso inicial este planteamiento, el resultado se ubica en la parte final como un resultado de confirmación posterior a todo lo explicado en los apartados anteriores.

Ho: La presencia de *Spirulina* en las muestras no presenta dependencia entre la zona donde se procedió a identificar.

H1: La presencia de *Spirulina* en las muestras presenta dependencia entre la zona donde se procedió a identificar.

Para analizar las variables se empleó la prueba estadística H de Kruskal-Wallis y una prueba de Chi cuadrado. El software para el análisis estadístico fue

SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). El análisis estadístico de las dos pruebas, dio como resultado valores de $p \leq 0.05$ en todas las zonas analizadas. Se procedió a rechazar la hipótesis nula (H_0). Es decir, se acepta la hipótesis alternativa al existir dependencia de la zona con la presencia de *Spirulina*, concordando con los resultados que se explicaron en esta investigación. Considerando que cada zona tiene un factor particular, es decir el tiempo que fue dragado y la presencia o ausencia de la cianobacteria *Spirulina* (Alonso, 1998, p.4). En el anexo 6, se puede observar el resultado de realizar una prueba de Kruskal Wallis y prueba de Chi cuadrado por cada fecha de recolección en cada zona asignada.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Durante la fase de muestreo en los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre, se llegó a la conclusión de la presencia del género *Spirulina* en 5 de las 6 zonas asignadas. La cianobacteria identificada fue *Spirulina*, perteneciente a la familia Spirulinaceae. Se determinó morfológica y taxonómicamente dos especies *Spirulina subsalsa* y *Spirulina major*.

Para el aislamiento y purificación de *Spirulina spp.* nativas, se concluyó que el medio M2, obtuvo mejores resultados microscópicos. Obteniendo cepas puras con el género *Spirulina*, mediante aumento en la cantidad de bicarbonato de sodio, conjugación de diluciones con aislamiento microscópico y uso de cicloheximida.

La zona 1, con 36 muestras con presencia de *Spirulina* y con un tiempo transcurrido de 6 años posterior al dragado. Permite concluir, que las especies nativas identificadas, se desarrollaron de forma adaptativa con el tiempo frente a una intervención antrópica (dragado).

6.2 Recomendaciones

Se recomienda la formulación de un medio específico para *Spirulina subsalsa* y *Spirulina major* que permita aminorar el tiempo de 29 días, que tardó el crecimiento.

Profundizar la identificación de *Spirulina* con un análisis molecular para corroborar el análisis microscópico y contrastar la morfología descrita.

Se recomienda conocer el aporte nutricional de las especies identificadas, empleando un análisis bromatológico que evalúe el porcentaje proteico.

REFERENCIAS

- Affan, M., Lee, D., Al-Harbi, S., Kim, H., Abdulwassi, N., Heo, S. y Kang, D. (2015). *Variation of Spirulina maxima biomass production in different depths of urea-used culture medium*. Brazilian Journal of Microbiology, 46(4), pp.991-1000. DOI: 10.1590/S1517-838246420140188
- Ali, S. y Saleh, A. (2012). *Spirulina-an overview*. Int J Pharm Pharm Sci, 4(3), 9-15.
- Alonso, M. (1998). *Las lagunas de la España peninsular*. Limnetica, 15(1), 176.
- Amores, S., Avilés, X., Cabrera, M., Cañete, M., Durán, L., Gálvez, P., Lima, M., López, S., Logroño, J., Peñaherrera, S., Reyes, A. y Rodas, P. (2005). *Identidad y Ciudadanía de las Mujeres: (La experiencia de cinco proyectos auspiciados por el Fondo para la Igualdad de Género-Ecuador)*. Editorial Abya Yala.
- Anantharaman, K., Brown, C., Hug, L., Sharon, I., Castelle, C., Probst, A., Thomas, B., Singh, A., Wilkins, M., Karaoz, U., Brodie, E., Williams, K., Hubbard, S., Banfield, J. (2016). *Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system*. Nature Communications, 7: 13219 DOI: 10.1038/ncomms13219
- Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Academic press, pp.1-445
- Baicha, Z., Salar-García, M. J., Ortiz-Martínez, V. M., Hernández-Fernández, F. J., de los Ríos, A. P., Labjar, N. y Elmahi, M. (2016). *A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells*. Fuel Processing Technology, 154, pp.104-116.

- Ballot, A., Dadheech, P. y Krienitz, L. (2004). *Phylogenetic relationship of Arthrospira, Phormidium and Spirulina strains from Kenyan and Indian waterbodies*. *Algological Studies*, 113(1), 37-56. Recuperado el 8 de Diciembre del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/233706306_Phylogenetic_relationship_of_Arthrospira_Phormidium_and_Spirulina_strains_from_Kenyan_and_Indian_waterbodies
- Basílico, G, De Cabo, L, Faggi, A. (2013). *Impacts of composite wastewater on a Pampean stream (Argentina) and phytoremediation alternative with Spirodela intermedia Koch (Lemnaceae) growing in batch reactors*. *J Environ Manag* 115:53–59. DOI: 10.1016/j.jenvman.2012.11.028.
- Bengtsson L., Herschy, R. y Fairbridge, R. (2012). *Encyclopedia of Lakes and reservoirs*. Springer. 1-985. Recuperado el 9 de Julio del 2017 de <http://www.springer.com/la/book/9781402056161>
- Bergey. (1829). *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*. Recuperado el 10 de Septiembre del 2016 de <https://link.springer.com/book/10.1007%2F0-387-29298-5>
- Bolch, C. J., & Blackburn, S. I. (1996). *Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa Kütz.* *Journal of Applied Phycology*, 8(1), 5-13. DOI: 10.1007/BF02186215
- Bonilla, S. (2009). *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Documento Técnico PHI-LAC N°16. Montevideo.
- Bortz, G. y Di Bello, M. (2015). *Investigadores, biotecnología y desnutrición infantil: una exploración de dos modelos de gestión de I+ D pública para resolución de problemas sociales locales*. *DESAFÍOS Y DILEMAS DE LA UNIVERSIDAD Y LA CIENCIA EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE EN EL SIGLO XXI*, pp.401. Recuperado el 10 de Julio del 2017 de

<https://www.teseopress.com/universidadciencia/chapter/investigadores-biotecnologia-y-desnutricion-infantil-una-exploracion-de-dos-modelos-de-gestion-de-id-publica-para-resolucion-de-problemas-sociales-locales-2/>

- Brasil, B., G. de Siqueira, F., Salum, T., Zanette C., y Spier, M. (2017). *Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories*. *Algal Research*, 25, 76-89. DOI: 10.1016/j.algal.2017.04.035
- Bray, N. y Cohen, M. (2010). *Dragado por el Desarrollo*. 6ta Edición. Asociación Internacional de Empresas de Dragado. Recuperado el 12 de Junio del 2017 de <https://www.iadc-dredging.com/ul/cms/fck-uploaded/documents/PDF%20Publications/dredging-for-development-spanish.pdf>
- Brennan, L. y Owende, P. (2010). *Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577. DOI:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Büdel, B. (2011) *Cyanobacteria: Habitats and Species. Plant Desiccation Tolerance*. *Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, Berlin: Springer , 215, 11-21. DOI: 10.1007/978-3-642-19106-0_2
- Buen Vivir, P. N. (2013). *Plan Nacional de Desarrollo/Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017*. Quito, Ecuador. Recuperado el 9 de Mayo del 2017 de <http://www.buenvivir.gob.ec/>
- Cai, H., Savenije, H. H., Yang, Q., Ou, S. y Lei, Y. (2012). *Influence of river discharge and dredging on tidal wave propagation: Modaomen Estuary case*. *Journal of Hydraulic Engineering*, 138(10), 885-896. DOI: 10.1061/(ASCE)HY.1943-7900.0000594
- Caicedo, C., Marcillo, F., Rodríguez, A., Caicedo, M. y Eduardo, L. (2016). *Aplicación de los entornos virtuales en las aulas universitarias: Un enfoque de aprendizaje Colaborativo y Cooperativo a través de la*

aplicación de un plan de acción estratégico para fortalecer el proceso enseñanza. 1(17), 3Ciencias: Manabí, Ecuador. 1-226. DOI: 10.17993/DidInnEdu.2016.17

Camacho, J. V. (2001). *Eliminación biológica de fósforo en aguas residuales urbanas.* Univ de Castilla La Mancha, 122. Recuperado el 24 de Febrero del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&id=8Vlu05kqFEgC&q=doi#v=onepage&q=doi&f=false>

Cameán, A. y Repetto, M. (2012). *Tóxicos formados durante el procesado, preparación y almacenamiento de los alimentos: Toxicología alimentaria.* Ediciones Díaz de Santos. Recuperado el 20 de Marzo del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=RQ0-9CuKobwC&printsec=frontcover&dq=T%C3%B3xicos+formados+durante+el+procesado,+preparaci%C3%B3n+y+almacenamiento+de+los+alimentos:+Toxicolog%C3%ADa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiV-6CzqMbVAhUD5iYKHRBHBloQ6AEIJDA#v=onepage&q=T%C3%B3xicos%20formados%20durante%20el%20procesado%20preparaci%C3%B3n%20y%20almacenamiento%20de%20los%20alimentos%3A%20Toxicolog%C3%ADa&f=false>

Campbell, N., Reece, J. (2007). *Biología.* Ed. Médica Panamericana. 1-1532

Cárdenas, C. Y Islas, A. (2015). *Identificación de algas y cianobacterias.* Jóvenes en la ciencia, 1(1), 193-198. Recuperado el 2 de Febrero del 2017 de <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/616>

Castenholz, R. (2001). *General characteristics of the cyanobacteria.* Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. DOI: 10.1002/9781118960608.cbm00019

- Catalá, L. (2013). *Contribución al estudio del crecimiento y las posibilidades del aprovechamiento termoquímico de las microalgas Nannochloropsis gaditana y Nannochloropsis oculata*. Recuperado el 01 de Mayo del 2017 de https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/36415/1/tesis_catala_esteve.pdf
- Cervantes, M. (2007). *Conceptos fundamentales sobre ecosistemas acuáticos y su estado en México. Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México*. Instituto Nacional de Ecología-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, DF, 37-67. Recuperado el 28 de Marzo de https://books.google.com.ec/books?id=uWlrklx-r3oC&pg=PA37&dq=Conceptos+fundamentales+sobre+ecosistemas+acu%C3%A1ticos+y+su+estado+en+M%C3%A9xico.+Perspectivas+sobre+conservaci%C3%B3n+de+ecosistemas+acu%C3%A1ticos+en+M%C3%A9xico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiSmK_brMbVAhUGKiYKHVusDUAQ6AEIJDA#v=onepage&q=doi&f=false
- Cox, P., Banack, S. y Murch, S. (2003). *Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13380-13383. DOI: 10.1073/pnas.2235808100
- Curtis, H. y Schnek, A. (2008). Curtis. *Biología*. Ed. Médica Panamericana. 1-1160.
- Chen, L., Rossi, F., Deng, S., Liu, Y., Wang, G., Adessi, A. y De Philippis, R. (2014). *Macromolecular and chemical features of the excreted extracellular polysaccharides in induced biological soil crusts of different ages*. *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 1-9. DOI: 10.1016/j.soilbio.2014.07.004
- Dawes, C. (1991). *Comunidades de Fitoplancton*. Botánica Marina. LIMUSA, Balderas, México. 1-650

- De Morais, M., Da Silva, C., Henrard, A. y Costa, J. (2015). *Carbon dioxide mitigation by microalga in a vertical tubular reactor with recycling of the culture medium*. African Journal of Microbiology Research, 9(33), 1935-1940. DOI: 10.5897/AJMR2015.7632
- Del Ebro, C. (2005). *Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua*. Protocolos de muestreo y análisis para fitobentos. Ministerio del Ambiente-España. Recuperado el 11 de Abril del 2017 de http://www.mapama.gob.es/es/agua/publicaciones/Protocolos_muestreo_biologico_con_portada_tcm7-16059.pdf
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P., (2016). *Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides*, Biotechnology Advances. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.001
- Delgadillo, O. Camacho, A. Pérez, L. y Andrade, M (2010). *Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales*. Nelson Antequera. Recuperado el 5 de Junio del 2017 de <http://www.aguasresiduales.info/revista/libros/depuracion-de-aguas-residuales-por-medio-de-humedales-artificiales>
- Departamento de Ecología, genética y evolución. (2015). *Ecosistemas de aguas continentales o epicontinentales*. Recuperado el 12 de Octubre del 2016 de http://www.ege.fcen.uba.ar/wp-content/uploads/2014/05/limnolog%C3%ADa_-JUNIO-2015-Estud.pdf
- Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones – PRO ECUADOR (2016). Perfil Sectorial de Agroindustria. Recuperado el 12 de Octubre del 2016 <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/04/PERFIL-AGROINDUSTRIA.pdf>

- Du, W., Jongbloets, J., Hernández, H., Bruggeman, F., Hellingwerf, K. y Dos Santos, F. (2016). *Photonfluxostat: A method for light-limited batch cultivation of cyanobacteria at different, yet constant, growth rates*. *Algal Research*, 20, 118-125. DOI: 10.1016/j.algal.2016.10.004
- Dvořák, P., Poulíčková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D. A. y Papini, A. (2015). *Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification*. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), 739-757. DOI: 10.1007/s10531-015-0888-6
- Erazo, M. y Cárdenas, R. (2013). *Ecología: impacto de la problemática ambiental actual sobre la salud y el ambiente*. Ecoe Ediciones. 1-248. Recuperado el 13 de Diciembre del 2016 de <https://www.ecoediciones.com/libros/ecologia-y-medio-ambiente/ebook-ecologia-impacto-de-la-problematica-ambiental-actual-sobre-la-salud-y-el-ambiente-1ra-edicion/>
- Erfteimeijer, P., Riegl, B., Hoeksema, B. y Todd, P. (2012). *Environmental impacts of dredging and other sediment disturbances on corals: a review*. *Marine Pollution Bulletin*, 64(9), 1737-1765. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.05.008
- FAO. (2013). *Estrategia Acción Nutrición (EAN) en la provincia de Chimborazo*. Recuperado el 29 de Agosto del 2016 de http://coin.fao.org/coin-static/cms/media/16/13657948421470/estrategia_accin_nutricin.pdf
- Frers, C. (2008). *El uso de plantas acuáticas para el tratamiento de aguas residuales*. *Observatorio Medioambiental*, 11, 301-305. Recuperado el 16 de Marzo del 2017 de http://www.ambientum.com/revista/2008/enero/Tratamiento_aguas_residuales.asp
- Gershwin, M. y Belay, A. (Eds.). (2007). *Spirulina in human nutrition and health*. CRC press. Recuperado el 23 de Enero del 2017 de

<https://www.crcpress.com/Spirulina-in-Human-Nutrition-and-Health/Gershwin-Belay/p/book/9781420052565#googlePreviewContainer>

- Gallardo, T. y Cobelas, M. (1989). *Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas*. Botánica complutensis, 15 (9). DOI: 10.5209/BOCM.7403
- Gándara, A. (2011). *Conceptos básicos de gestión ambiental y desarrollo sustentable*. Instituto Nacional de Ecología. Recuperado el 2 de Marzo del 2017 de <http://lappes.iee.usp.br/?q=blog/conceptos-b%C3%A1sicos-de-gesti%C3%B3n-ambiental-y-desarrollo-sustentable-gloss%C3%A1rio>
- Ghaeni, M. y Roomiani, L. (2016). *Review for Application and Medicine Effects of Spirulina, Microalgae*. Journal of Advanced Agricultural Technologies, 3(2). DOI: 10.18178/joaat.3.2.114-117
- Gómez, M., Tirado, D. y Posada, J. (2013). *Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas*. La experiencia en La Guajira, Colombia. Ambiente y Desarrollo, 17(32), 113. DOI: 10.11144/6049
- Gomont, M. A. (1893). *Monographie des oscillariées: (Nostacacées Homocystées)*. Masson,15.
- Google Maps. (2016). *Laguna de Colta*. Recuperado el 11 de octubre del 2016 de <https://www.google.es/maps/place/Laguna+de+Colta/@-1.7375,-78.7733428,14z/data=!4m5!3m4!1s0x91d303e706112a35:0xcbb1a86ffdc650bc!8m2!3d-1.7375!4d-78.7558333>
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. 2016. *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. Recuperado el 20 de Octubre del 2016 de <http://www.algaebase.org>.
- Gupta, R. C. (Ed.). (2016). *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00001-2

- Habib, M., Huntington, T., Parvin, M. y Hasan, M. (2008). *A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular, 1034(33). Recuperado el 10 de Noviembre del 2016 de <http://www.fao.org/3/contents/b2d01d94-4707-54c1-9f65-01f699fc6d07/i0424e00.htm>
- Hargraves, P. y Viquez, R. (1980). *Spirulina subsalsa* Oersted en Costa Rica. *Estructura y posible importancia comercial*. Biol Trop, 22, 304-307. Recuperado el 9 de Octubre del 2016 de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25468/25719>
- Haro, S. y Perales, J. (2015). *Cinética de consumo de nutrientes y crecimiento de un bloom de microalgas en un fotobiorreactor High Rate Algae Pond (HRAP)*. Tecnología y ciencias del agua, 6(3), 15-31. Recuperado en 26 de abril de 2017, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-24222015000300002&lng=es&tlng=es
- Henrikson, R. (1994). *Microalga Spirulina, superalimento del futuro*. Segunda Edición. Ediciones Urano. Recuperado el 14 de Octubre del 2016
- Huarachi, R., Yapo, Ú., Dueñas, A., Condori, J., Pacheco, D. y Soto, J. (2015). *Cultivation of Arthrospira platensis (Spirulina) in curved doubly tubular photobioreactor to environmental conditions in the South of the Perú*. Revista Colombiana de Biotecnología, 17(1), 142-149. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50679
- Hug, L., Baker, B., Anantharaman, K., Brown, C., Probst, A., Castelle, C., Butterfield, C., Hemsdorf, A., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D., Finstad, K., Amundson, R., Thomas, B. y Banfield, J. (2016). *A new view of the tree of life*. Nature Microbiology, 1, 16048. DOI:10.1038/nmicrobiol.2016.48

- INEC (2015). *Estadísticas*. Recuperado el 12 de Octubre del 2017 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/>
- limsam. (2016). *Spirulina*. Recuperado el 26 de Octubre del 2016 de <http://iimsam.org/en/>
- Jaramillo, J. (2015). *Informe de avance de actividades- SINAPROY*
- Jiang, L., Pei, H., Hu, W., Ji, Y., Han, L. y Ma, G. (2015). *The feasibility of using complex wastewater from a monosodium glutamate factory to cultivate Spirulina subsalsa and accumulate biochemical composition*. *Bioresource technology*, 180, 304-310. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.019
- Karkos, P., Leong, S., Karkos, C., Sivaji, N. y Assimakopoulos, D. (2011). *Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. DOI: 10.1093/ecam/nen058
- Landaeta, C. (1995). *Potenciales impactos ambientales generados por el dragado y la descarga del material dragado*. Instituto Nacional de Canalizaciones. Dirección de Proyectos e Investigación, Caracas–Venezuela. Recuperado el 7 de febrero del 2017 de <http://ocw.um.es/ciencias/ecologia/lectura-obligatoria-1/landaeta-01.pdf>
- Lee, K., Eisterhold, M. L., Rindi, F., Palanisami, S. y Nam, P. (2014). *Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources*. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 5(2), 333–339. DOI: 10.4103/0976-9668.136178
- Lewis, T. L. (2016). *Ecuador's Environmental Revolutions: Ecoimperialists, Ecodependents, and Ecoresisters*. MIT Press. Recuperado el 3 de Febrero del 2017 de <http://www.jstor.org/stable/j.ctt1b349k7>

- Logue, J., Findlay, S. y Comte, J. (2016). *Microbial Response to environmental changes*. *Frontiers in Microbiology*. 6:1364. DOI:10.3389/fmicb.2015.01364
- López, B. y Bianco, D. (2005). *El Censo Neotropical de Aves Acuáticas 2004: una herramienta para la conservación*. Wetlands International- America de Sur. Recuperado el 28 de Noviembre del 2016 de http://eco-index.org/search/pdfs/754report_1.pdf
- Loza, V.(2011). *Biodiversidad de cianobacterias en ríos de la Comunidad de Madrid. Análisis polifásico y aplicación en biomonitorización*. Recuperado el 12 de Febrero del 2017 de <https://repositorio.uam.es/handle/10486/6856>
- Llames, M . y Zagarese, H. (2009). *Lakes and Reservoirs of South America*. In: *Gene E. Likens, Encyclopedia of Inland Waters*. 2, 533-543 Oxford: Elsevier. DOI: 10.1016/B978-012370626-3.00034-X
- Lakes and Reservoirs of South America (PDF Download Available). Available from:
https://www.researchgate.net/publication/223655919_Lakes_and_Reservoirs_of_South_America [accessed Aug 9, 2017].
- Lv, J., Wu, H. y Chen, M. (2011). *Effects of nitrogen and phosphorus on phytoplankton composition and biomass in 15 subtropical, urban shallow lakes in Wuhan, China*. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 41(1), 48-56. DOI: 10.1016/j.limno.2010.03.003
- Madkour, F., Kamil, A. y Nasr, H. (2012). *Production and nutritive value of Spirulina platensis in reduced cost media*. *The egyptian journal of aquatic research*, 38(1), 51-57. DOI: 10.1016/j.ejar.2012.09.003

- Maldonado, M, Maldonado-Ocampo J., Ortega, H., Encalada, A., Carvajal-Vallejos, F., Rivadeneira, J., Acosta, F., Jacobsen, D. y Rivera-Rondón, C.(2011). *Biodiversity in aquatic systems of the tropical Andes*, 276-294.
- Manap, N. y Voulvoulis, N. (2016). *Data analysis for environmental impact of dredging*. *Cleaner Production*, 137, 394-404. DOI: 10.1016/j.jclepro.2016.07.109
- Masojídek, J. y Torzillo, G. (2014). *Mass cultivation of freshwater microalgae*, *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, Elsevier, 1–13. DOI: 10.1016/B978-008045405-4.00830-2
- Mata, T., Martins, A. y Caetano, N. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: a review*. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232. DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Mendoza, H., De la Jara, A. y Portillo, E. (2011). *Planta piloto de cultivo de microalgas: Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias*. España: Gráficas Tenerife SA. 66. Recuperado el 2 de Diciembre del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/271209975_Planta_piloto_de_cultivo_de_microalgas
- Mérida, L., Zepka, L. y Jacob, E. (2013). *Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias/photobioreactor: tool for mass cultivation of cyanobacteria*. *Ciencia y Tecnología*, 6(2), 9. Recuperado el 13 de Marzo del 2017 de http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V6N2%20fotobiorreactor.pdf
- Ministerio de desarrollo urbano y vivienda. (2013). *Proyecto: Generación y restauración de áreas verdes para la ciudad de Guayaquil: "Guayaquil ecológico"*. Recuperado el 15 de Julio del 2017 de

<http://www.habitatyvivienda.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2015/06/PROYECTO-GUAYAQUIL-ECOLOGICO.pdf>

- Ministerio del Ambiente (2011). Proyecto de Recuperación y manejo de la Laguna de Colta en Chimborazo. Recuperado el 17 de Marzo del 2016 de <http://www.ambiente.gob.ec/proyecto-de-recuperacion-y-manejo-de-la-laguna-de-colta-en-chimborazo-finaliza-con-buenos-resultados/>
- Mishra, T., Joshi, M., Singh, S., Jain, P., Kaur, R., Ayub, S. y Kaur, K. (2013). *Spirulina: The Beneficial Algae*. Int. J App. Micro. Sci, 2(3), 21-35.
- Morales, E.(2002). *Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria Anabaena sp. PCC 7120 en función del pH y CO2*. Interciencia, 27(7), 373-378. DOI: 0378-1844/02/07/373-06
- Mulkidjanian, A., Koonin, E., Makarova, K., Mekhedov, S., Sorokin, A., Wolf, Y. y Haselkorn, R. (2006). *The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(35), DOI:13126-13131.
- Municipio de Colta. (2013). Laguna de Colta. Recuperado el 11 de Octubre del 2016 de <http://www.municipiodecolta.gob.ec/municolta/index.php/colta/2012-10-01-19-19-46>
- Munro, S. (2010). El río y la forma. Introducción a la geomorfología fluvial. RIL editors. Recuperado el 10 de Diciembre del 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=WB-WtOx86XoC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Nagle, V., Mhalsekar, N. y Jagtap, T.(2010). *Isolation, optimization and characterization of selected Cyanophycean members*. Recuperado el 17 de Noviembre del 2017 de

<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/10015/1/IJMS%2039%282%29%20212-218.pdf>

- Naranjo, R., Maisincho, J., Koch, A., Flores, F., Arias, J., y Izquierdo, A. (2016). *Isolation and identification of eukaryotic algae and cyanobacteria from five geothermal springs in Ecuador*. Journal of Biotechnology, 231 (77). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.279
- Nassar, M. y Khairy, H. (2014). *Checklist of phytoplankton species in the Egyptian waters of the Red Sea and some surrounding Habitats (1990-2010)*. Annual Research & Review in Biology 4(23): 3566-3585. DOI : 10.9734/ARRB/2014/10866
- Needham, J. (2016). *La química de la vida*. Fondo de Cultura Económica. Recuperado el 6 de Diciembre del 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=hKlcDgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Ortiz, J., Flores, F., Maldonado, S., Mihae, R., Naranjo, B., Muñoz, D. y Rajeswari, B. (2017). *Molecular characterization and antioxidant potential of Andean Chlorophytes from Ecuador*. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol, 7(05), 56-60. DOI: 10.7324/JAPS.2017.70510
- Pachacama, L., Tirado, J., Duchicela, J., Manjunatha, B., Kundapur, R. y Rajeswari, B. (2016). *Evaluation of microalgae's (Chlorella sp. and Synechocystis sp.) pollutant removal property: Pig effluent as a live stock discharge*. 6(8): 135-141. Doi: 10.7324/JAPS.2016.60821
- Pandey, J., Pathak, N. y Tiwari, A. (2010). *Standardization of pH and light intensity for the biomass production of Spirulina platensis*. J. Algal Biomass Utln, 1(2), 93-102. Recuperado el 16 de Enero del 2017 de <http://jalgalbiomass.com/paper9vol1no2.pdf>

- Pelizer, L., De Carvalho, J. y De Oliveira Moraes, I. (2015). *Protein production by Arthrospira (Spirulina) platensis in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support*. *Biotechnology Reports*, 5, 70-76. DOI: 10.1016/j.btre.2014.12.006
- Pérez, G. y Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical*. Universidad de Antioquia. *Ciencia y Tecnología*, (15), Recuperado el 25 de Enero del 2017 de 1-440. https://books.google.com.ec/books?redir_esc=y&hl=es&id=FA5Jr7pXF1UC&q=doi#v=onepage&q=doi&f=false
- Pineda, R., Martínez, F., Garduño, G., y Olvera, R. (2011). *Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la Ciudad de México*. *Polibotánica*, (31), 31-50. Recuperado el 21 de Diciembre del 2017 <http://www.herbario.encb.ipn.mx/pb/esp/num31/tema3esp.htm>
- Ponce, E. (2013). *Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo*. *Idesia (Arica)*, 31(1), 135-139. DOI: 10.4067/S0718-34292013000100016
- Prats, J., Morales, R., Dolz, J. y Armengol, J. (2014). *Aportaciones de la limnología a la gestión de embalses*. *Ingeniería del agua*, (18), 80-94. DOI: 10.4995/ia.2014.3145
- Ramanan, R., Kim, B., Cho, D., Oh, H. y Kim, H. (2016). *Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications*. *Biotechnology advances*, 34(1), 14-29. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003
- Ramírez, L. y Olvera, R. (2006). *Uso tradicional y actual de Spirulina sp. (Arthrospira sp.)* *Interciencia*, 31(9), 657-663. DOI: 0378-1844/06/09/657-07

- Raof, B., Kaushik, B. y Prasanna, R. (2006). *Formulation of a low-cost medium for mass production of Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*, 30(6), 537-542. DOI: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006
- Raof, B., Kaushik, B. y Prasanna, R. (2006). *Formulation of a low-cost medium for mass production of Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*, 30(6), 537-542. DOI: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006
- Ravi, M., De Lata S., Azharuddin, S., Paul, S. (2010). *The beneficial effects of Spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties*. *Nutr Diet Suppl* 2:73–83. DOI: 10.2147/NDS.S9838
- Rendón, L., Ramírez, M. y Vélez, Y. (2013). *Microalgas para la industria alimenticia*. *Universidad Pontificia Bolivariana*. Medellín, Colombia: 1-71. Recuperado el 12 de Marzo del 2017 de https://www.researchgate.net/publication/299769593_Microalgas_para_la_industria_alimenticia
- Richmond, A., Karg, S. y Boussiba, S. (1982). *Effects of bicarbonate and carbon dioxide on the competition between Chlorella vulgaris and Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* (23), 17-1411. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076489
- Rincón, J. y Chávez, N.(2006). *Glosario de biotecnología (No. Sirsi) i9789707280496*. Recuperado el 12 de Diciembre del 2017 de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y2775s/y2775s01.pdf>
- Rout NP, Khandual S. Gutierrez-Mora A., Gallardo-Valdéz J., Rodriguez- Garay B, Ibarra-Montoya JL, Vega-Valero G. (2013). *Isolation, identification and germplasm preservation of different native Spirulina species from Western Mexico*. *Am J Plant Sciences* (4), 65–71. DOI: 10.4236/ajps.2013.412A2009
- Sadava, D. y Purves, W (2009). *Vida/Life: La ciencia de la biología/The Science of Biology*. Ed. Médica Panamericana. Recuperado el 8 de Marzo del 2017 de

https://books.google.com.ec/books?id=RIw3cKDaMfEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Samboni, M. (2015). *Eutrofización de agua*. Recuperado el 27 de Octubre del 2016 de http://marcesamboni.blogspot.com/2015_08_01_archive.html

Sánchez, O. (2007). *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México*. Instituto Nacional de Ecología. Recuperado el 11 de Marzo del 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=uWlrklx-r3oC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Santander, T., Lara, A. y Muñoz, I. (2007). *Ecuador: informe anual. Censo Neotropical de Aves Acuáticas 2006*. Recuperado el 12 de Octubre del 2016 de http://lac.wetlands.org/Portals/4/Informe%20Ecuador_EDITADO.pdf

Santander, T., Terán, K., Mueces, T., Lara, A., Llumiquinga, C., y Guevara, E. (2011). *Registros inusuales de aves costeras en lagunas Altoandinas de Ecuador*. *Cotinga*, (33), 105-107. Recuperado el 16 de Febrero del 2017 de https://www.researchgate.net/publication/234002006_Registros_inusuales_de_aves_costeras_en_lagunas_Altoandinasde_Ecuador

Santos, T., Bastos de Freitas, B., Moreira, J., Zanfonato, K., y Costa, J. (2016). *Development of powdered food with the addition of Spirulina for food supplementation of the elderly population*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 216-220. DOI: 10.1016/j.ifset.2016.07.016

Serediak, N., Prepas, E., Putz, G. (2014). *Eutrophication of freshwater systems*. Turekian, H.D.H.K. (Ed.). *Treatise on Geochemistry*, second edition

Elsevier, Oxford, (11)8, 305–323. DOI: 0.1016/B978-0-08-095975-7.00908-6

Sigma (2016). *Product information Cycloheximide*. Recuperado el 14 de Noviembre del 2016 de http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c7698pis.pdf

Stancheva, R., Sheath, Kociolek, Fetscher y Fuller (2012). *Soft bodied stream algae of California*. Recuperado el 22 de Noviembre del 2016 de http://dbmuseblade.colorado.edu/DiatomTwo/sbsac_site/genus.php?g=Spirulina

Stanier, R., y Villanueva, J. (1996). *Microbiología*. Reverté. Recuperado el 28 de Octubre del 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=2u-6Q2XCMDgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. y Renganathan, S. (2016). *Macroalgae and microalgae as a potential source for comercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (55), DOI:909-941. 10.1016/j.rser.2015.11.026

Torrentera, L. y Tacon, A. (2000). *Documento preparado para el proyecto gcp/rla/075/ita apoyo a las actividades regionales de acuicultura para america latina y el caribe*. Recuperado el 01 de Mayo del 2017 de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S00.htm#TOC>

Torres-Ariño, A. (2004). *Uso de cianobacterias en la producción de antibióticos*. *Ciencia y Mar*, 8(23), 43-52. Recuperado el 5 de Noviembre del 2016 de <http://www.umar.mx/revistas/23/cianobacterias.pdf>

Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana. Recuperado el 7 de Mayo del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&printsec=fron>

tcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- Unicef. (2016). *Salud y nutrición*. Recuperado el 9 de Agosto del 2016 de https://www.unicef.org/ecuador/children_17993.htm
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., Vargas, F., y Harris, C. (2015). *El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas*. *Ciencias marinas*, 41(4), 297-313. DOI:10.7773/cm.v41i4.2492
- Valverde, F., Romero-Campero, F., León, R., Guerrero, M. y Serrano, A. (2016). *New challenges in microalgae biotechnology*. *European journal of protistology*, 55, 95-101. DOI: 10.1016/j.ejop.2016.03.002
- Vicente, E., Hoyos, C., Sánchez, P., y Cambra, J. (2005). *Metodología para el establecimiento el Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua. Protocolos de muestreo y análisis para fitoplancton*, Ministerio del Ambiente, España. Recuperado el 9 de Diciembre del 2017 de http://www.mapama.gob.es/es/agua/publicaciones/Protocolos_muestreo_biologico_con_portada_tcm7-16059.pdf
- Vonshak, A. (Ed.). (1997). *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press. Recuperado el 11 de Octubre del 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=IKaKEqo6pB8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Wan, D., Wu, Q. y Kuča, K. (2016). *Chapter 12_Spirulina*. (Ed). *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00001-2
- Wassenaar, Trudy M. (2016). *Bacteria : The Benign, the Bad, and the Beautiful* Hoboken, US: Wiley-Blackwell, 2011. DOI: 10.1002/9781118143391.ch1

- Whitton, B. y Potts, M. (Eds.). (2007). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Springer Science & Business Media. DOI: 10.1007/0-306-46855-7
- Wu, L., Sun, Q., Desmeth, P., Sugawara, H., Xu, Z., McCluskey, K. y Robert, V. (2016). *World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide*. Nucleic Acids Research, gkw903. DOI: 10.1093/nar/gkw903
- Youssef, N. H., Couger, M. B., McCully, A. L., Criado, A. E. G., & Elshahed, M. S. (2015). *Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: A review*. Journal of advanced research, 6(3), 269-282. DOI: 10.1016/j.jare.2014.10.005
- Zeglin, L. (2015). *Stream mitochondrial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research*. Front. Microbio. 6:454 DOI:10.3389/fmicb.2015.01364

ANEXOS

Anexo 1. Medios líquidos de prueba

MEDIO ZARROUK PARA SPIRULINA

		Reactivos	g/L
Macronutrientes	1	NaHCO ₃	16,8 g
	2	K ₂ HPO ₄	0,5
	3	K ₂ SO ₄	1
	4	NaCl	1
	5	MgSO ₄	0,2
	6	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,04
	7	FeSO ₄	0,01
	8	EDTA	0,08
Micronutrientes	1	H ₃ BO ₃	2,86
	2	ZnSO ₄ *4H ₂ O	0,222
	3	Na ₂ MoO ₄	0,0177
	4	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,079

Adaptado de (Raof *et al*, 2006, p.34; Madkour *et al*, 2012, p.56)

MEDIO BG-11 MODIFICADO

		Reactivos	g/L
Macronutrientes	1	Ácido cítrico	6 g/L
	2	Citrato férrico de amonio	6 g
	3	NaNO ₃	1,5
	4	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	40g/L
	5	MgSO ₄ *7H ₂ O	75g/L
	6	CaCl ₂ *2H ₂ O	36 g/L
	7	Na ₂ CO ₂	20 g/L
	8		
Micronutrientes	1	H ₃ BO ₃	2,86
	2	ZnSO ₄ *4H ₂ O	0,220
	3	Na ₂ MoO ₄	0,391
	4	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,079
	5	MnCl ₂ *4H ₂ O	1,810

Adaptado de (Andersen, 2005, p. 435 ; Allen y Stanier ,1968; Rippka *et al*, 1979)

Medio *Spirulina* (*Arthrospira*)

Macronutrientes	Solución I en 500 ml		
	2	NaHCO ₃	13,61
	3	Na ₂ CO ₃	4,03g
	4	K ₂ HPO ₄	0,50
	Solución II en 500ml		
	6	NaNO ₃	2,5
	7	K ₂ SO ₄	1
	8	NaCl	1
	9	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
	10	CaCl ₂ *H ₂ O	0,04
	11	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,01
	12	Na ₂ EDTA*H ₂ O	0,08
Micronutrientes	1	HBO ₃	10
	2	MnSO ₄ *7H ₂ O	1g/L
	3	ZnSO ₄ *7H ₂ O	1g/L
	4	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,005g/L
	5	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1g/L
	6	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,7g/L

Modificado de (Andersen, 2005, p.467; Aiba y Ogawa, 1977, p.69; Schlösser 1994, p.89).

Anexo 2. Componentes del Medio *Spirulina* MSE

Componente	Cantidad para 1 L (g/L)
<u>Solución en 500ml</u>	
Bicarbonato de sodio NaHCO ₃	8
Fosfato monopotásico KH ₂ PO ₄	0.5
<u>Solución en 500ml</u>	
Nitrato de potasio KNO ₃	2
Cloruro de sodio NaCl	5
Sulfato de magnesio MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Solución de hierro (gotas)	4

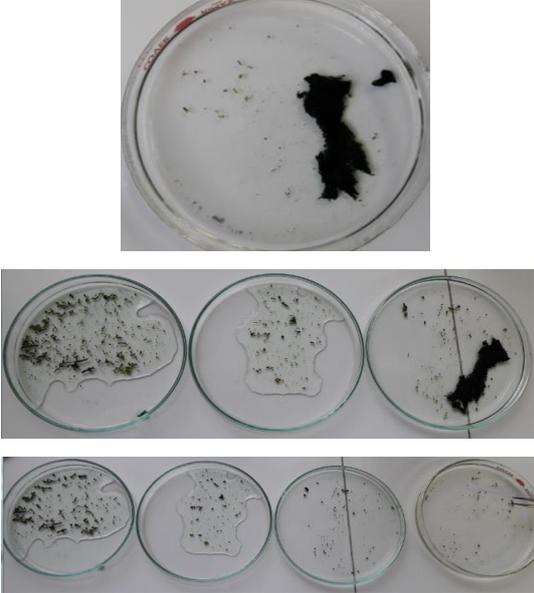
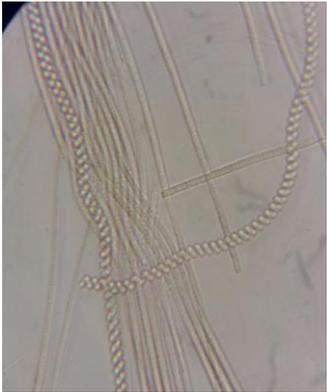
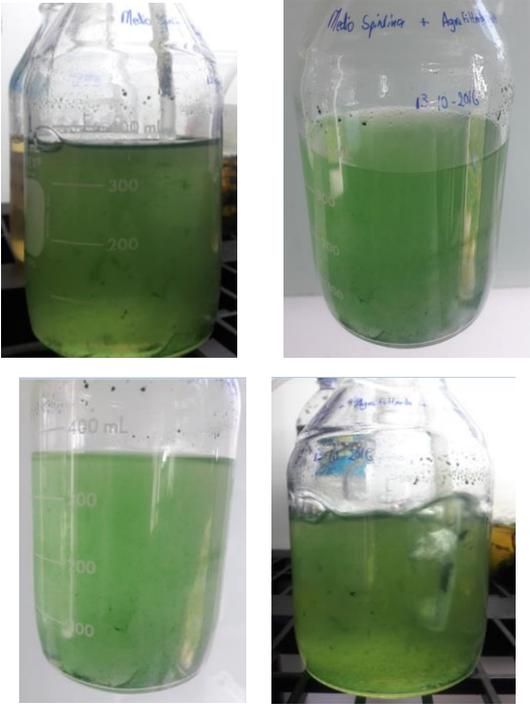
Anexo 3. Variación de color del medio de *Spirulina* durante 15 días.

7-Nov-2016		14-Nov-2016	
8-Nov-2016		17-Nov-2016	
11-Nov-2016		17-Nov-2016	

Anexo 4. Biomasa pesada en gramos comprada con la biomasa inicial y final

Biomasa inicial	Biomasa final	17-Nov-2016
0,88g	1,29g	

Anexo 5. Inoculación de medio liquido

PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO		
 <p>Biomasa pesada: 0,70g</p>	 <p>Lavado con agua de laguna filtrada autoclavada: cada caja Petri 3ml</p>	<p>Lavado, pesado y realización del medio: 13-10-2016</p>
<p>FOTOS MICROSCOPIO</p>  <p>Figura 1. En 100x + aumento</p>		<p>18-10-2016</p>

Anexo 6. Pruebas estadísticas no paramétricas

FECHA	Prueba de Kruskal Wallis	Prueba de Chi-cuadrado																				
04 de Septiembre del 2016	<p>Estadísticos de prueba^{a,b}</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PresenciaSpirulina</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado</td> <td>23,125</td> </tr> <tr> <td>gl</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Valor P</td> <td>0,000319</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Prueba de Kruskal Wallis b. Variable de agrupación: Zona</p>		PresenciaSpirulina	Chi-cuadrado	23,125	gl	5	Valor P	0,000319	<p>Pruebas de chi-cuadrado</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Valor</th> <th>gl</th> <th>Valor P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado de Pearson</td> <td>23,319^a</td> <td>5</td> <td>,000293</td> </tr> <tr> <td>N de casos válidos</td> <td>120</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>a. 6 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,83.</p>		Valor	gl	Valor P	Chi-cuadrado de Pearson	23,319 ^a	5	,000293	N de casos válidos	120		
		PresenciaSpirulina																				
Chi-cuadrado	23,125																					
gl	5																					
Valor P	0,000319																					
	Valor	gl	Valor P																			
Chi-cuadrado de Pearson	23,319 ^a	5	,000293																			
N de casos válidos	120																					
10 de Septiembre del 2016	<p>Estadísticos de prueba^{a,b}</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PresenciaSpirulina</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado</td> <td>23,125</td> </tr> <tr> <td>gl</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Valor P</td> <td>,000319</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Prueba de Kruskal Wallis b. Variable de agrupación: Zona</p>		PresenciaSpirulina	Chi-cuadrado	23,125	gl	5	Valor P	,000319	<p>Pruebas de chi-cuadrado</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Valor</th> <th>gl</th> <th>Valor P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado de Pearson</td> <td>23,319^a</td> <td>5</td> <td>,000293</td> </tr> <tr> <td>N de casos válidos</td> <td>120</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>a. 6 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,83.</p>		Valor	gl	Valor P	Chi-cuadrado de Pearson	23,319 ^a	5	,000293	N de casos válidos	120		
		PresenciaSpirulina																				
Chi-cuadrado	23,125																					
gl	5																					
Valor P	,000319																					
	Valor	gl	Valor P																			
Chi-cuadrado de Pearson	23,319 ^a	5	,000293																			
N de casos válidos	120																					
9 de Octubre del 2016	<p>Estadísticos de prueba^{a,b}</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PresenciaSpirulina</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado</td> <td>22,610</td> </tr> <tr> <td>gl</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Valor P</td> <td>,000401</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Prueba de Kruskal Wallis b. Variable de agrupación: Zona</p>		PresenciaSpirulina	Chi-cuadrado	22,610	gl	5	Valor P	,000401	<p>Pruebas de chi-cuadrado</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Valor</th> <th>gl</th> <th>Valor P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado de Pearson</td> <td>22,800^a</td> <td>5</td> <td>,000369</td> </tr> <tr> <td>N de casos válidos</td> <td>120</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>a. 6 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,33.</p>		Valor	gl	Valor P	Chi-cuadrado de Pearson	22,800 ^a	5	,000369	N de casos válidos	120		
		PresenciaSpirulina																				
Chi-cuadrado	22,610																					
gl	5																					
Valor P	,000401																					
	Valor	gl	Valor P																			
Chi-cuadrado de Pearson	22,800 ^a	5	,000369																			
N de casos válidos	120																					
13 de Noviembre del 2016	<p>Estadísticos de prueba^{a,b}</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PresenciaSpirulina</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado</td> <td>26,098</td> </tr> <tr> <td>gl</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Valor P</td> <td>,000085</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Prueba de Kruskal Wallis b. Variable de agrupación: Zona</p>		PresenciaSpirulina	Chi-cuadrado	26,098	gl	5	Valor P	,000085	<p>Pruebas de chi-cuadrado</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Valor</th> <th>gl</th> <th>Valor P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-cuadrado de Pearson</td> <td>26,318^a</td> <td>5</td> <td>,000077</td> </tr> <tr> <td>N de casos válidos</td> <td>120</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>a. 6 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 4,33.</p>		Valor	gl	Valor P	Chi-cuadrado de Pearson	26,318 ^a	5	,000077	N de casos válidos	120		
		PresenciaSpirulina																				
Chi-cuadrado	26,098																					
gl	5																					
Valor P	,000085																					
	Valor	gl	Valor P																			
Chi-cuadrado de Pearson	26,318 ^a	5	,000077																			
N de casos válidos	120																					

Anexo 7. Proporciones de variación de color entre MSE

Día	M1	M2	M3	M4
	20/80	30/70	50/50	70/30
	20 % Agua laguna 80% Medio <i>Spirulina</i>	30% Agua laguna 70% Medio <i>Spirulina</i>	50% Agua Laguna 50% Medio <i>Spirulina</i>	70% Agua laguna 30% Medio <i>Spirulina</i>
0	-	-	-	-
2	-	+	-	-
4	-	+	-	-
6	-	++	-	-
8	-	++	+	-
10	+	++	+	-
12	+	++	+	+
14	+	++	+	+
16	+	+++	+	+
18	+	+++	+	+
20	+	+++	+	+
22	-	+++	+	+
24	-	+++	+	+
26	-	+++	+	-
28	-	++	-	-
30	-	++	-	-

