

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

***Análisis in vitro* del crecimiento de microalgas del fitoplancton en diferentes medios  
de cultivo y condiciones de incubación**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga**

**CECILIA CORALÍA NÚÑEZ ALBERCA**

**Quito, 2024**



Certifico que la Disertación de grado en Microbiología de la Srta. Cecilia Coralía Núñez Alberca ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

PhD. Diana Astorga García

Directora de la Disertación

Quito, 13 de febrero de 2024

## **DEDICATORIA**

A mis padres, hermanos y amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres, por brindarme su guía en este camino que culmino gracias a su amor y apoyo incondicional. Gracias a mis hermanos, Paúl y Andrés, que siempre me impulsan en todo y he aprendido de ellos.

Gracias a la Empresa Pública Metropolitana De Agua Potable y Saneamiento de Quito (EPMAPS-Q) a cargo de la MSc. Diana Ontaneda y a su equipo pues, con su aprovisionamiento de muestras, asesoría e intercambio constante pude desarrollar este trabajo de investigación.

Extiendo un enorme y sincero gracias a la PhD. Diana Astorga, por su apoyo constante desde el día que la conocí, por confiar en mí y darme la oportunidad de conocer más del campo de Ficología, rama de la Microbiología que me apasiona y en la que puedo desenvolverme en un ambiente profesional. Destaco su paciencia y profesionalismo. Estoy muy agradecida por conocer a la Microbióloga Kelly López, que me ha animado a tomar la posta por lo quiero y, sobre todo, gracias por todos tus consejos.

Eterna gratitud al MSc. Fernando Santacruz, por su apoyo ilimitado, consejos y paciencia desde el día que lo conocí como mi tutor hasta el día de hoy.

A Bolívar Salas y a su equipo, les extiendo mi gratitud por su colaboración en el desarrollo de mi trabajo de titulación, con el préstamo de equipos y asesoría personalizada durante el desarrollo de este trabajo.

Esta investigación se enmarca en el contrato marco de acceso a recursos genéticos MAE-DNB-2019-0125-A sin el que no hubiera sido posible la investigación presentada.

**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>METODOLOGÍA</b> .....	5
<b>RESULTADOS</b> .....	6
<b>DISCUSIÓN</b> .....	12
<b>CONCLUSIONES</b> .....	22
<b>REFERENCIAS</b> .....	24

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento promedio de taxones microalgales en medio BBM y Nitrofoska con aireación durante el periodo de experimentación.....	20
---	----

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Identificación taxonómica de microalgas presentes en la muestra de fitoplancton de origen.....	16
Tabla 2. Registro de taxones microalgales en medio BBM a lo largo de 24 días.....	18
Tabla 3. Registro de taxones microalgales en fertilizante agrícola Nitrofoska a lo largo 24 días.....	19
Tabla 4. Promedio y desviación estándar del crecimiento microalgal (en $10^4$ y $10^6$ células $\text{ml}^{-1}$ ) en 24 días.....	23

**MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN****Revista**

PUCE

**Título**

***Análisis in vitro* del crecimiento de microalgas del fitoplancton en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación**

**Autores**Coralía N. Alberca<sup>1</sup>

Diana A. García \*

**Correo Electrónico**[cor2nun@gmail.com](mailto:cor2nun@gmail.com)[dastorga199@puce.ed.ec](mailto:dastorga199@puce.ed.ec)**Filiación**

<sup>1</sup>Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de Octubre 1076, Quito-Ecuador

Este trabajo de investigación se presenta a partir de la siguiente página en el formato de la Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

## **Análisis *in vitro* del crecimiento de microalgas del fitoplancton en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación**

### ***In vitro* analysis of phytoplankton microalgae growth in different culture media and incubation conditions**

#### **RESUMEN**

La diversidad microalgal en ambientes lénticos es bioindicador del estado de los ecosistemas y la evaluación de diferentes escenarios puede facilitarse a través de su cultivo. Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad y el crecimiento microalgal de fitoplancton de agua dulce de 0.5 m de profundidad en medios de cultivo líquidos BBM y Nitrofoska, bajo fotoperiodo 12:12 o 18:6, pH 5-6, 7-9 o 9-11, con o sin aireación. Se hizo el recuento de taxones a lo largo de 24 días de un total de 1728 alícuotas de fitoplancton provenientes de 72 biorreactores. Se identificaron 11 taxones, de los que únicamente *Comasiella arcuata.*, *Staurastrum chaetoceras* y *Chlorococcum* sp., por su plasticidad a las condiciones ambientales ensayadas, predominaron. Los demás desaparecieron inmediatamente o tuvieron una presencia discreta. Pudo destacarse como bioindicadores de eutrofización a *Trachelomonas volvocina* y *Coelastrum* sp., de bajo contenido de fósforo a *Oocystis lacustris*, *Dinobryon divergens* y *Staurastrum chaetoceras*, de enriquecimiento en nitratos a *Octacanthium octocorne* y *Botryococcus braunii*. y de eutrofización y acidez a *Sphaerocystis* sp. Las mejores condiciones para mantener en cultivo al mayor número de taxones del medio natural fueron el medio BBM, bajo fotoperiodo de 18:6, pH 7-9 y aireación.

**PALABRAS CLAVE:** bioindicadores, condiciones de incubación, fitoplancton, microalgas, sucesión.

#### **ABSTRACT**

The microalgal diversity is a bioindicator of the state of lentic environments. The evaluation of different scenarios can be facilitated by their culture-based study. This is why the objective of this research was to evaluate diversity and growth of freshwater phytoplankton from a depth of 0.5 m in liquid culture media BBM y Nitrofoska, under 12:12 or 18:6 photoperiod, pH 5-6, 7-9 or 9-11, with or without aeration. Taxons were counted along 24 days in a total of 1728 aliquots coming from 72 bioreactors. Eleven taxons were identified, From which only *Comasiella arcuata.*, *Staurastrum chaetoceras* y *Chlorococcum* sp. predominated because of

their adaptability to experimental conditions. The others disappeared right away or had a discreet presence. Some bioindicators could be pointed out: *Trachelomonas volvocina* y *Coelastrum* sp. for eutrofization, *Oocystis lacustris*, *Dinobryon divergens* y *Staurastrum chaetoceras* for low phosphorus charge, *Octacanthium octocorne* y *Botryococcus braunii* for nitrate enrichment and *Sphaerocystis* sp. for eutrofization and acidity. The best conditions for the maintenance of most taxones in culture were BBM media, under 18:6 photoperiod, pH 7-9 and aeration.

**KEY WORDS:** bioindicators, incubation conditions, microalgae, phytoplankton, succession.

## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos poseen diversos taxones fitoplanctónicos cuya diversidad, abundancia y distribución son propias del tipo de medio acuático, su localización geográfica y su estado trófico (Peraza, 2017). Conocer la abundancia de cada uno de los taxones como para comprender su verdadera importancia para el ecosistema y el ser humano es de interés para estudios ecológicos que involucren la reacción de la composición especie específica frente a cambios ambientales naturales o provocados antrópicamente (De León y Chalar, 2003). El fitoplancton de aguas continentales dulces está relacionado con ambientes de tipo léntico, aguas estancadas, lagos, lagunas y embalses. Las microalgas abarcan, en su mayoría, especies de Bacillariophyceae (diatomeas), Cyanophyceae (algas verdeazuladas), Zygnematomyceae (algas verdes) y Euglenophyceae (euglenas), mientras que el resto de las divisiones se presentan en porcentajes inferiores en la columna de agua (Oliva-Martínez et al., 2014; Sarmiento, 2017).

La diversidad de especies microalgales fitoplanctónicas depende del tipo de cuerpo de agua. Por ejemplo, en México, se han registrado alrededor de 200 especies en lagos, 238 en lagunas y 358 en ríos (Oliva-Martínez et al., 2014). Los hábitats analizados tienen características particulares, que fluctúan en tiempo y espacio. Éstas pueden beneficiar o perjudicar diferencialmente el crecimiento de las poblaciones presentes en la comunidad de un ecosistema acuático natural (Morales et al., 2013; Guamán y González, 2016).

Por este motivo, existen parámetros específicos que se consideran al momento de procesar muestras naturales para consolidar cultivos de laboratorio con fines pedagógicos o científicos

(Martínez, 2021). El cultivo de microalgas requiere de controles en parámetros ambientales, nutricionales, estado biológico del cultivo, intensidad de luz, temperatura, pH, demanda de oxígeno y dióxido de carbono (Hernández-Pérez y Labbé, 2014; Ansilago, 2021; Martínez, 2021). Además, se vincula también con turbidez, corrientes y profundidad (Gómez et al., 2001).

No obstante, los nutrientes esenciales para el crecimiento suelen ser provistos por medios de cultivo enriquecidos, principalmente con carbono y compuestos como amonio y nitrato (Hernández-Pérez y Labbé, 2014), en función de las características del medio natural que se quiera emular. Por otro lado, resulta fundamental tomar en cuenta que no todos los taxones son cultivables en laboratorio y que los resultados de cada ensayo *in vitro* no son directamente extrapolables a la naturaleza (Morales et al., 2013). A pesar de ello, pueden proporcionar indicios acerca de las consecuencias de cambios en el forzamiento ambiental sobre la composición y la abundancia de los taxones y sus fluctuaciones poblacionales derivadas (Gómez et al., 2001).

El crecimiento ideal de microalgas está relacionado, también, con las características propias del organismo (Morales et al., 2013). Cada uno requiere de un conjunto específico de condiciones óptimas y posee o adquiere diferentes niveles de tolerancia frente a las fluctuaciones ambientales (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). El crecimiento activo en laboratorio puede conseguirse si se garantiza un inóculo viable, macronutrientes, microelementos, un rango particular de condiciones fisicoquímicas y la energía suficiente para mantener el sistema (Abalde et al., 1995).

Sin embargo, aún existen dificultades para establecer cultivos microalgales en laboratorio (Morales et al., 2013). Muchas microalgas no han logrado caracterizarse morfológicamente con el detalle que se requiere para facilitar identificaciones taxonómicas ligadas a técnicas cultivo-dependientes (López y Barrientos, 2005). La mayor parte de especies cultivables no logran purificarse hasta obtener cultivos monoalgales (Abalde et al., 1995). Otras tienen un tiempo de vida limitado en laboratorio (Sarmiento, 2017; Morales et al., 2013).

En algunos casos, el establecimiento de cultivos mixtos o monoalgales de microalgas permite el desarrollo, la identificación, la investigación y la bioprospección de diversos taxones (Garduño-Solórzano et al., 2011) en medios de cultivo como Bold's Basal Medium (BBM) y Nitrofoska, cuya composición nutricional facilita el crecimiento de varias divisiones

simultáneamente (Brito et al., 2006; Lloyd et al., 2021). Además, faculta la evaluación de las poblaciones en términos de abundancia, rendimiento del cultivo, biomasa generada y necesidades de mantenimiento para su supervivencia en el tiempo (Morales et al., 2013). Estos aspectos resultan fundamentales a la hora de cultivar microalgas para la generación de ceparios y bases de datos con las características sobresalientes de las microalgas cultivadas para docencia e investigación.

Los diversos estudios bajo condiciones controladas pueden contribuir a la comprensión del efecto del forzamiento ambiental en el crecimiento algal y en la sucesión de poblaciones algales en el tiempo (Hernández-Pérez y Labbé, 2014; Gómez et al., 2001). Además, contribuyen a comprender su rol en el equilibrio de los ciclos biogeoquímicos, donde actúan en la captación, la asimilación y la producción de diferentes elementos necesarios para su supervivencia y la de otros grupos microbianos relacionados metabólicamente (Oliva-Martínez et al., 2014; Ramos et al., 2016; Guamán y González, 2016) o dependientes de estos de acuerdo a su fisiología y posición trófica (Abalde et al., 1995). Esto se logra a pesar de no conseguirse simular todas las condiciones ambientales experimentadas en el ambiente natural (Martínez, 2021).

Finalmente, el cultivo de diversas especies presentes en una muestra de fitoplancton tiene relevancia social desde el punto de vista del establecimiento de estrategias de control del crecimiento de taxones potencialmente nocivos y/o de proliferación masiva relacionados a la calidad de fuentes de agua (Abalde et al., 1995). Cabe recalcar que se abre una brecha de investigación enfocada en los diferentes beneficios de cada una de las microalgas encontradas y cultivadas *in vitro* (Morales et al., 2013). Actualmente, el cultivo de microalgas tiene diferentes aplicaciones en diversas industrias: innovación en productos microalgales con alto valor agregado, desarrollo de productos cosméticos, utilización de colorantes en la industria textil, alternativas de biorremediación, elaboración de productos relacionados con biocombustibles y bioplásticos, desarrollo de biorrefinerías... (Bonnisone et al., 2023).

En este contexto, esta propuesta pretendió proporcionar respuesta a la pregunta de investigación central: ¿qué medio de cultivo y bajo qué condiciones de incubación se consigue cultivar el mayor número posible de taxones fitoplanctónicos como para continuar con la generación de conocimiento en torno a su ecología y mantenimiento en laboratorio?

## METODOLOGÍA

Con el objetivo de evaluar la diversidad y el crecimiento de microalgas a partir de una muestra de fitoplancton de agua dulce en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación, se realizó un experimento en el Laboratorio de Ficología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en Quito, Ecuador, para examinar el efecto del medio y de las condiciones de incubación en el desarrollo de la mayor diversidad posible de microalgas a partir de una muestra de fitoplancton, por un lado, y, en segunda instancia, caracterizar el crecimiento de las poblaciones microalgales de acuerdo a las condiciones de cultivo. El fertilizante inorgánico comercial Nitrofoska, en su presentación sólida, se preparó mediante el método modificado de Verdugo (2016), con una concentración de fertilizante de 3 g/L en agua destilada. A continuación, se preparó el medio BBM mediante el uso de un total de cinco soluciones *stock*, de macro y micronutrientes (Morales, 2012). Los volúmenes correspondientes para la preparación de 1L de BBM fueron: 60 ml de macronutrientes, 1 ml de micronutrientes (EDTA, soluciones de hierro, ácido bórico) y 1 ml de solución de metales traza disueltos en 936 ml de agua destilada (Devi y Sahoo, 2015, p. 557). Cada biorreactor contuvo un volumen total de 300 mL de medio de cultivo (Martínez et al., 2004).



Para cada unidad experimental o biorreactor, se planificó una combinación de condiciones para evaluar dos medios de cultivo, Nitrofoska y BBM; tres rangos de pH, 5-6, 7-9 y 9-11, dos fotoperiodos (luz:oscuridad), 12:12 y 18:6, y dos condiciones de aireación, presencia y ausencia. La luz fue provista por lámparas fluorescentes de luz blanca de baja intensidad ( $10\text{--}75 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El fotoperiodo se controló mediante temporizadores programados y se monitoreó el pH semanalmente mediante el uso de papel de pH. Además, se aplicó aireación focalizada mediante el uso de compresores de aire para cada tratamiento que permitió la aireación directa de los biorreactores con mangueras plásticas estériles y posterior sellado de la entrada de aire (Andrade et al., 2009). Así, se confeccionaron 24 tratamientos por triplicado, con un total de 72 biorreactores con 299 ml del medio de cultivo respectivo cada uno. Una alícuota de la muestra de fitoplancton obtenida por método de arrastre a 0.5 m (EPMAPS, 2016) fue fijada con *transeu* 1:1 inmediatamente tras su recepción en el laboratorio para preservar intacta la biodiversidad y la abundancia de los taxones presentes (Guamán y González, 2016). El volumen restante fue distribuido como inóculo inicial para los 72 biorreactores empleados en el ensayo, a razón de 1 ml por biorreactor.

Para evaluar el crecimiento microalgal y la diversidad de taxones presentes a lo largo del experimento, se tomó una alícuota de 0.5 mL por réplica de todos los tratamientos cada tres días, se lo colocó en un tubo eppendorf y se lo fijó con solución *transeau* 1:1. Para el recuento respectivo a partir de la alícuota previamente fijada, se cargó y cuantificó por tres ocasiones las microalgas contenidas en la cámara (Sedwick Rafter o Neubauer en función de los taxones presentes y el tiempo de experimentación), a la vez que se las identificaba de acuerdo a morfología, organización celular, número y localización de los cloroplastos. Para ello, se utilizaron claves taxonómicas de Guamán y González (2016); Guiry y Guiry (2022); Morales et al., (2013); López et al. (2019) y Jacome-Pilco et al., (2021). Así, se realizó un total de 1728 recuentos durante un periodo de experimentación de 24 días. También, cada tres días, se repuso medio líquido para mantener el volumen de cultivo.

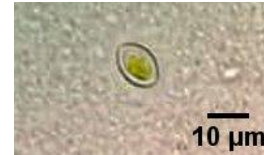
## RESULTADOS

En el inóculo inicial, se identificaron diez taxones (Tabla 1) de los que se registró su evolución a lo largo de 24 días. Existieron ocho taxones que se mantuvieron presentes durante todo el tiempo de experimentación, independientemente del tratamiento analizado. Estos fueron: *Comasiella arcuata*, *Chlorococcum* sp., *Oocystis lacustris*, *Botryococcus braunii*, *Sphaerocystis* sp., *Octacanthium octocorne*, *Dinobryon divergens* y *Staurastrum chaetoceras*. Por otra parte, taxones como *Trachelomonas volvocina* y *Coelastrum* sp. desaparecieron desde el segundo recuento. Otros registraron presencia en tratamientos puntuales (Tablas 2 y 3).

**Tabla 1: Identificación taxonómica de microalgas presentes en la muestra de fitoplancton de origen.**

División	Género	Especie	Fotografía (40 x)
Chlorophyta	<i>Comasiella</i>	<i>arcuata</i>	
	<i>Chlorococcum</i>	sp.	

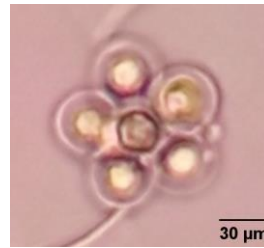
*Oocystis lacustris*



*Botryococcus braunii*



*Coelastrum* sp.

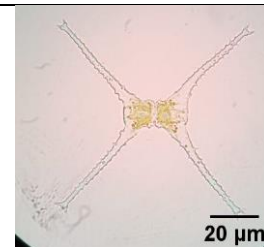


*Sphaerocystis* sp.



Charophyta

*Staurostrum chaetoceras*





*Octacanthium octocorne*



*Cosmarium* sp.



Ochrophyta	<i>Dinobryon</i>	<i>divergens</i>	
Euglenozoa	<i>Trachelomonas</i>	<i>volvocina</i>	

En el medio BBM, *Comasiella arcuata* prolongó su crecimiento en fotoperiodo 12:12 únicamente en pH 7-9 con aireación (Figura 1a, Tabla 4), mientras que, en fotoperiodo 18:6, su presencia fue detectable solo el día 9 en pH 7-9 con aireación y el día 12 en pH 9-11 sin aireación. En cambio, *Staurastrum chaetoceras* evidenció un crecimiento limitado en fotoperiodo 12:12 con pH 7-9 en presencia de aireación (Figura 1c, Tabla 4) y en pH 9-11 con aireación su crecimiento fue intermitente (Figura 1d, Tabla 4). En fotoperiodo 18:6, pH 7-9 y aireación, el crecimiento de este taxón fue fluctuante (Figura 1e, Tabla 4). *Chlorococcum* sp., por su parte, mostró permanencia en el tiempo en fotoperiodo 18:6 con pH 7-9 y en presencia de aireación (Figura 1b, Tabla 4). Se presentaron únicamente en intervalos cortos *Oocystis lacustris*, *Botryococcus braunii*, *Octacanthium octocorne*, *Cosmarium* sp. y *Dinobryon divergens* (Tabla 2).

**Tabla 2: Registro de taxones microalgales en medio BBM a lo largo de 24 días.**

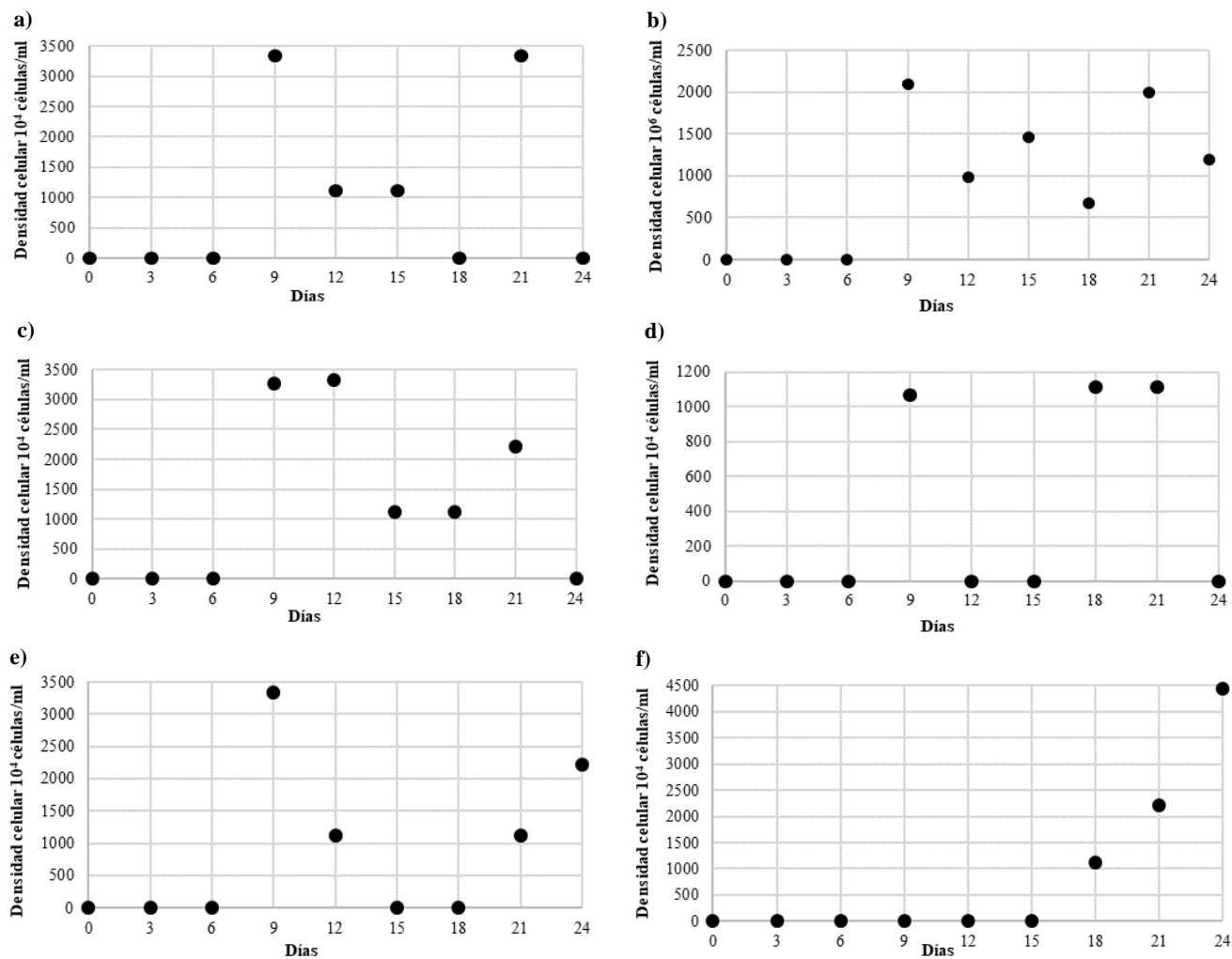
División	Género	Especie	Medio de cultivo Bold Basal										
			Fotoperiodo		pH	Aireación		Día					
			a	b		c	s	9	12	15	18	21	24
Chlorophyta	<i>Comasiella</i>	<i>arcuata</i>	X	X	7-9	ab	b	ac bc	ac bs	ac	—	ac	—
					9-11	ab	b	—	bs	bc	ac	ac	—
	<i>Chlorococcum</i>	sp.	X	X	5-6	b	b	—	—	—	bcs	—	—
					7-9	ab	b	bc	bc	bc	bcs	ac bcs	bc
	<i>Oocystis</i>	<i>lacustris</i>	X	X	5-6	b	—	—	—	—	bc	—	—
					7-9	a	—	ac	—	—	—	—	
9-11					—	b	—	—	bs	—	—	—	
7-9					ab	—	—	bc	—	—	ac	—	
Charophyta	<i>Botryococcus</i>	<i>braunni</i>	X	X	7-9	ab	—	—	bc	—	—	ac	—
					5-6	a	—	ac	—	—	bs	—	—
	<i>Staurastrum</i>	<i>chaetoceras</i>	X	X	7-9	ab	b	ac bc	ac bc bs	ac	ac	ac bc	bc
					9-11	ab	—	ac	bc	—	ac bc	ac	—
	<i>Octacanthium</i>	<i>octocorne</i>	X	X	5-6	ab	—	—	—	ac bc	—	—	—
					7-9	ab	—	—	—	ac bc	—	ac	ac
9-11					ab	ab	ac bc	—	—	as bs	—	ac	
<i>Cosmarium</i>	sp.	X	X	7-9	ab	b	—	bcs	ac	—	—	—	
				9-11	a	—	ac	—	—	ac	—	ac	
Ochrophyta	<i>Dinobryon</i>	<i>divergens</i>	X	—	5-6	a	—	—	—	ac	ac	—	—

a, fotoperiodo (*luz:oscuridad*) 12:12; b, 18:6; c, con aireación; s, sin aireación; X, presente; —, *indetectable*.

**Tabla 3: Registro de taxones microalgales en fertilizante agrícola Nitrofoska a lo largo 24 días.**

División	Género	Especie	Medio de cultivo fertilizante Nitrofoska											
			Fotoperiodo		pH	Aireación		Día						
			a	b		c	s	9	12	15	18	21	24	
Chlorophyta	<i>Comasiella</i>	<i>arcuata</i>	X	X	5-6	b	—	—	—	—	—	bc	—	—
					7-9	ab	—	—	—	—	ac bc	ac	—	
					9-11	a	—	—	—	ac bc	bc	—	—	
	<i>Chlorococcum</i>	sp.	X	X	5-6	b	b	—	bc	bs	—	—	—	—
					7-9	ab	b	—	bc	bs	bs	ac	—	
					9-11	ab	—	—	—	ac	bc	bc	—	
	<i>Oocystis</i>	<i>lacustris</i>	X	—	7-9	a	—	ac	—	—	—	—	—	—
					<i>Sphaerocystis</i>	sp.	X	X	5-6	—	b	—	—	bs
	7-9	a	b	—					ac	bs	—	—	—	
Charophyta	<i>Staurastrum</i>	<i>chaetoceras</i>	X	X	5-6	b	a	—	—	as	as bc	bc	bc	
					7-9	b	—	—	bc	bc	—	—	—	
					9-11	ab	ab	ac bc	—	ac bc	as bc bs	—	—	
	<i>Octacanthium</i>	<i>octocorne</i>	X	X	5-6	b	—	—	—	bc	bc	—	—	
					7-9	a	a	ac	as	as	—	—	—	
					9-11	b	b	—	—	bc	bs	—	—	
	<i>Cosmarium</i>	sp.	X	—	5-6	—	a	—	—	—	as	—	—	
					9-11	a	—	—	—	ac	—	—	—	

a, fotoperiodo (*luz:oscuridad*) 12:12; b, 18:6; c, con aireación; s, sin aireación; X, presente; —, *indetectable*.



**Figura 1. Crecimiento promedio de taxones microalgales en medio BBM y Nitrofoska con aireación durante el periodo de experimentación.**

a) *Comasiella arcuata* en BBM, fotoperiodo 12:12, pH 7-9 y aireación; b) *Chlorococcum* sp. en BBM, fotoperiodo 18:6, pH 7-9 y aireación; c) *Staurastum chaetoceras* en BBM, fotoperiodo 12:12, pH 7-9 y aireación; d) *S. chaetoceras* en BBM, fotoperiodo 12:12, pH 9-11 y aireación; e) *S. chaetoceras* en BBM, fotoperiodo 18:6, pH 7-9 y aireación; f) *S. chaetoceras* en Nitrofoska, fotoperiodo 18:6, pH 5-6 y aireación.

En el medio de cultivo Nitrofoska con fotoperiodo 12:12 tanto en presencia como en ausencia de aireación, no resaltó particularmente ningún taxón (Tabla 3). *Oocystis lacustris*, *Comasiella arcuata*, *Cosmarium* sp., *Staurastrum chaetoceras*, *Octacanthium octocorne*, *Sphaerocystis* sp. y *Chlorococcum* sp. se mantuvieron presentes en, al menos, un tratamiento, sin mostrar crecimiento microalgal demasiado conspicuo. En fotoperiodo 18:6, se desarrollaron *Chlorococcum* sp., *Comasiella arcuata*, *Octacanthium octocorne* y *Sphaerocystis* sp., taxones

cuya presencia se registró en intervalos cortos (Tabla 3). *S. chaetoceras* fue el taxón más notable, su crecimiento se evidenció en los tres diferentes rangos de pH con aireación, pero el de 5-6 aparentó ser el más apto para su crecimiento (Figura 1f, Tabla 4). Además, su presencia en pH 7-9 y 9-11 no se evidenció con facilidad.

## DISCUSIÓN

### Susceptibilidad de los taxones a las condiciones experimentales

La riqueza de especies y su abundancia en comunidades fitoplanctónicas puede verse afectado por interacciones biológicas, luminosidad, temperatura, salinidad y concentración de nutrientes en cultivos *in vitro* (Pereira et al., 2021). Al establecer rangos de pH ligeramente amplios en este ensayo, se permitió que este parámetro se mantuviera constante en el medio de cultivo durante el periodo de experimentación. En general, la presencia o la ausencia de taxones estuvo relacionada con la insuficiencia de nutrientes en ambos medios de cultivo.

El experimento presentado evaluó la susceptibilidad de los taxones presentes en una muestra fitoplanctónica al cultivo bajo condiciones ambientales controladas como una forma de abordar el fenómeno de sucesión. Los taxones *Coelastrum* sp. y *Trachelomonas volvocina* fueron especialmente sensibles. Se trata de taxones que se encuentran en el ambiente de forma natural. Su presencia puede indicar el estado trófico del cuerpo de agua, pero al cultivarlos bajo parámetros específicos no proliferaron. Esto requiere de un análisis cercano de cuáles pudieron haber sido las causas de su falta de adaptación a las condiciones proporcionadas en el laboratorio.

El euglenozoo *Trachelomonas volvocina* únicamente se evidenció en el inóculo inicial y desapareció del registro desde el recuento del día 3 en todos los tratamientos ensayados. Precisamente, este género microalgal es característico de ecosistemas con alto contenido de hierro, nitratos y fosfatos y aguas estancadas con alto contenido de materia orgánica (Jiang et al., 2022). Al evaluar el medio de cultivo BBM, sus fuentes de hierro (sulfato de hierro heptahidratado 4.98 g/L) y fósforo (fosfato dipotásico 5.72 g/L) no se encontraron en formas biodisponibles para la supervivencia del organismo. Además, la fuente de nitrógeno (nitrato de sodio) se evidencia en mayor concentración (25 g/L) dentro de la solución de macronutrientes, pero no se presenta como fuente primaria debido a que la solución se prepara con varias sustancias que pueden restarle protagonismo y reaccionar entre sí.

Tabla 4: Promedio y desviación estándar del crecimiento microalgal (en  $10^4$ \* y  $10^6$ \*\* células  $ml^{-1}$ ) en 24 días.

Recuentos	BBM								Nitrofoska			
	Fotoperiodo 12:12				Fotoperiodo 18:6				Fotoperiodo 18:6			
	pH 7-9 <i>Comasiella arcuata</i>		pH 9-11 <i>Staurastrum chaetoceras</i>		pH 9-11 <i>Staurastrum chaetoceras</i>		pH 7-9 <i>Staurastrum chaetoceras</i>		pH 7-9 <i>Chlorococcum sp.</i>		pH 5-6 <i>Staurastrum chaetoceras</i>	
Días	$\bar{x}$	$\Sigma$	$\bar{x}$	$\Sigma$	$\bar{x}$	$\Sigma$	$\bar{x}$	$\Sigma$	$\bar{x}$	$\Sigma$	$\bar{x}$	$\Sigma$
0	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00**	0.00	0.00*	0.00
3	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00**	0.00	0.00*	0.00
6	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00**	0.00	0.00*	0.00
9	3333.00*	0.17	3237.00*	0.17	1067.00*	0.09	3333.00*	0.29	2100.00**	18.04	0.00*	0.00
12	1111.00*	0.19	3333.00*	0.09	0.00*	0.00	1111.00*	0.10	989.00**	8.56	0.00*	0.00
15	1111.00*	0.10	1111.00*	0.10	0.00*	0.00	0.00*	0.00	1467.00**	12.70	0.00*	0.00
18	0.00*	0.00	1111.00*	0.10	1111.00*	0.10	0.00*	0.00	678.00**	5.87	1111.00*	0.10
21	3333.00*	0.17	2222.00*	0.19	1111.00*	0.10	1111.00*	0.10	2000.00**	8.00	2222.00*	0.19
24	0.00*	0.00	0.00*	0.00	0.00*	0.00	2222.00*	0.19	1189.00**	10.30	4444.00*	0.10

$\bar{x}$  promedio/densidad celular;  $\Sigma$ , desviación estándar.

El medio Nitrofoska, en cambio, se destaca por su alto contenido de nitrógeno (30%) y bajo contenido de óxido fosfórico y óxido de potasio (10%), compuestos que no se encuentran como fuentes nutricionales. La ausencia de *T. volvocina* podría estar relacionada con el empleo de los medios BBM y Nitrofoska, que no resultan nutricionalmente suficientes para el desarrollo de un euglenozoo que prefiere ambientes eutróficos. La otra posibilidad es que, simplemente, no sea cultivable.

*Coelastrum* sp. también estuvo presente únicamente en el inóculo inicial. Es una microalga de agua dulce de amplia distribución en ambientes planctónicos, árticos o tropicales y su presencia es abundante en ambientes eutróficos donde actúa como bioindicador. Se remarca su importancia en el ámbito industrial por la producción de lípidos, carotenoides e incluso en la biorremediación de aguas residuales (Liang et al., 2020). Su cultivo ideal para la producción de biomasa es el medio BG11 sólido donde la concentración de N (nitrato de sodio) de 150 g/L es elevado comparado con los 25 g/L de BBM y el 30% en Nitrofoska (Rauytanapanit et al., 2019). Su ausencia durante el ensayo indica que los medios de cultivo utilizados no proveyeron de nutrientes suficientes, pues se trata de una microalga sin problemas de adaptación al cultivo en laboratorio.

Un segundo grupo de microorganismos resaltó por una presencia más bien discreta. Se trata del grupo conformado por *Oocystis lacustris*, *Octacanthium octocorne*, *Dinobryon divergens*, *Botryococcus braunii*, *Sphaerocystis* sp. y *Cosmarium* sp. Esto puede justificarse, sobre todo, por las condiciones nutricionales proporcionadas en el laboratorio, que no terminaron de ajustarse a requerimientos taxón-específicos, lo que se complejizó más por tratarse de cultivos mixtos. *Oocystis lacustris* y *Octacanthium octocorne*, por ejemplo, se evidenciaron esporádicamente en presencia y ausencia de aireación.

*Oocystis lacustris* se caracteriza por ser cosmopolita. Su morfología elipsoidal suele presentarse de manera individual o en cenobios de dos a cuatro células (Ramos et al., 2014). En este ensayo, se presentó como células individuales elipsoidales. En el ambiente, suele ser importante en la constitución de la biomasa del fitoplancton y su crecimiento es abundante en cuerpos de agua dulce, lagos y estanques (Stoyneva et al., 2007). En cultivo, esta especie presenta un crecimiento exponencial prolongado en medios mixtos con concentraciones bajas de fósforo (Giani y Delgado, 1998). Por lo tanto, las concentraciones de fosfato dipotásico (5.72 g/L) y dihidrógeno fosfato de potasio (17.5 g/L) del medio BBM pueden haber resultado ligeramente altas y asimilables por otros organismos presentes en el ensayo. El fertilizante

Nitrofoska, por su parte, puso a su disposición óxido de fósforo (V) y óxido de potasio al 10%. Por ende, el crecimiento microalgal pudo verse afectado a nivel nutricional durante el periodo de experimentación.

Mientras tanto, *Octacanthium octocorne*, en el medio natural, suele presentarse en ecosistemas de agua dulce y habita en el plancton. Su estructura es constante en esta especie. No obstante, suele evidenciar variaciones en la curvatura, orientación y tamaño de las espinas angulares (Bicudo et al., 2007), variaciones que no se evidenciaron en esta investigación. Cabe recalcar que esta microalga creció únicamente en medio Nitrofoska. Esto se relaciona con la concentración de nitrógeno en los medios de cultivo donde el nitrato de sodio (25 g/L) en BBM y nitrógeno total (30%) en Nitrofoska difieren en magnitud a las requeridas por la especie, pues sus necesidades de nitrógeno son superiores para adaptarse a ambientes controlados en laboratorio (Faustino y Bicudo, 2003).

Por otra parte, *Dinobryon divergens* es considerado como un microorganismo bioindicador de ambientes con bajo contenido de fósforo. Es común en regiones montañosas. Puede estar presente en ambientes oligotróficos y se caracteriza por formar ramificaciones con células en forma de gotas (Cavero et al., 2020). Algunas especies son fagotróficas cuya depredación bacteriana influye en la zona limnética y les permite mantenerse en ambientes con bajas concentraciones de fósforo (Guiry y Guiry, 2021; Lee, 1999, p. 388). El crecimiento óptimo de este género requiere que otros organismos reduzcan las concentraciones altas del fósforo, para asimilarlo con mayor facilidad, solo ahí puede competir eficazmente y su prevalencia en el ecosistema puede manifestarse aun con presencia de restos celulares (Lee, 1999).

La presencia de *Botryococcus braunii* se evidenció en BBM con pH 7-9 y aireación en periodos intermitentes. Se trata de un taxón fotosintético que se caracteriza por adaptarse lentamente en zonas templadas, tropicales, continentales y en varios ecosistemas: lagos, embalses, cavidades con agua retenida y en ambientes eutróficos (Órpez et al., 2009). Sintetiza y acumula varios tipos de hidrocarburos. Durante el proceso de síntesis de estos compuestos, requiere de alto consumo de energía, lo que se asocia con una tasa de crecimiento baja. Su crecimiento exponencial en condiciones ambientales es de 6-7 días, mientras que en cultivo monoalgal con aireación va de 3 a 5 días (Zhang et al., 2011). El medio de cultivo óptimo para el desarrollo de su biomasa debe contener soluciones de dihidrógeno fosfato de potasio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio y citrato férrico (Dayananda et al., 2005).

El medio adecuado para la producción de biomasa de *B. braunni* en cultivos monoalgales con aireación es el BG11 e incluso se plantea la utilización de medios alternativos como fuentes orgánicas: fructosa, glucosa, manosa y ácido láctico, con la glucosa como el carbohidrato que puede asimilar con mayor facilidad (Zhang et al., 2011). También, se usa el medio de cultivo Chun modificado bajo fotoperiodo 12:12 (Indrayani et al., 2022). En este estudio, el medio BBM no proporcionó citrato férrico ni nitrato de potasio, compuestos que afectaron su crecimiento. La detección puntual *Botryococcus* pudo haberse debido al bajo contenido de nitrato de sodio (25 g/L) y nitrato de cobalto hexahidratado (0.49 g/L), como únicas fuentes de nitrógeno.

*Sphaerocystis* sp. fue apreciable únicamente los 15 primeros días del ensayo, exclusivamente en medio Nitrofoska, en ambos fotoperiodos, los dos rangos de pH inferiores y en presencia y ausencia de aireación. Se presenta en forma de colonias esféricas sin flagelos y recubiertos por mucílago, con un cloroplasto único en forma de copa. Las colonias se forman por grupos de cuatro células. Su hábitat corresponde a lagos de agua dulce (Guiry y Guiry, 2023; Broady, 2007) y actúan como biorremediadores de aguas residuales de origen doméstico con nutrientes como cloruro de amonio (0.0381 g/L), nitrato de potasio (0.7218 g/L), nitrito de sodio (1.2320 g/L) y fosfato monopotásico (21.9500 g/L). Su crecimiento eficiente se produce únicamente en cultivos mixtos de *Chlorella* sp., *Closteriopsis* sp. y la cianobacteria *Microcystis* sp., donde el crecimiento exponencial de *Sphaerocystis* sp. llega hasta el día 7 y decrece inmediatamente después (Blandón, 2017). En este ensayo, no se registró ninguno de estos taxones acompañantes.

El medio Nitrofoska proveyó de óxido fosfórico, óxido de potasio y, en mayor concentración, nitrógeno a toda la comunidad algal. El crecimiento de *Sphaerocystis* sp. en el fertilizante no fue continuo, debido a que carece de la mayoría de nutrientes presentes en aguas residuales, pero el óxido fosfórico (al 10%) como única fuente de fósforo no resultó suficiente para que su crecimiento fuera prolongado. Esta clorofita no creció en el medio BBM, seguramente, por la ausencia de nutrientes como cloruro de amonio, nitrato de potasio y nitrito de sodio. El fosfato monopotásico, por otro lado, con concentración de 17.5 g/L frente a la concentración requerida de 21.9500 g/L resultó ser escaso para su crecimiento.

El registro de *Cosmarium* sp. fue puntual en BBM y Nitrofoska con y sin aireación, aunque ligeramente más apreciable en BBM bajo fotoperiodo 12:12 y pH 7-9. Se trata de una microalga unicelular solitaria de varios tamaños, cosmopolita y de amplia distribución en ambientes

ácidos, básicos, oligotróficos y eutróficos. Este género puede estar presente en aguas con alto contenido de potasio, magnesio y sodio (Araújo, 2006; Osório et al., 2018; Guiry y Guiry, 2013). Algunas especies son poco exigentes a nivel nutricional, pero su mantenimiento *in vitro* incluye el uso de medio BBM sólido, sin previa alteración de pH (Camacho, 2021). En este ensayo, únicamente se manejaron cultivos líquidos. El crecimiento microalgal resultó afectado en BBM debido a la concentración de potasio (fosfato monopotásico 17.5 g/L y fosfato dipotásico 5.72 g/L), magnesio (sulfato de magnesio heptahidratado 0.5 g/L) y sodio (nitrato de sodio 25 g /L y cloruro de sodio 2.50 g/L) que no fueron suficientes para el crecimiento sostenido de la microalga.

En resumen, varios taxones dejaron de registrarse o se evidenciaron muy puntualmente en los cultivos debido a su susceptibilidad a las condiciones de incubación. Potencialmente, el hecho de ser de difícil cultivo o porque las condiciones proporcionadas no fueron suficientemente favorables se cuentan entre las razones de su escasez. Los medios de cultivo proporcionados no contuvieron los nutrientes indispensables y/o las cantidades necesarias para viabilizar su crecimiento más adecuado, además de poner a prueba su competitividad en cultivos mixtos.

### **Microalgas competitivas y sus fluctuaciones**

En la otra cara del espectro, se encontraron las microalgas *Comasiella* sp., *Staurastrum chaetoceras* y *Chlorococcum* sp. Estas, salvo *S. chaetoceras* en medio Nitrofoska, demostraron haber culminado la fase de crecimiento exponencial y presentaron fluctuaciones constantes desde el día 9 hasta el día 21, en el caso del medio de cultivo Nitrofoska, y hasta el día 24 en BBM. Existen varias explicaciones posibles para su presencia continua y proliferación.

Los miembros de la familia Scenedesmaceae, considerada la más grande dentro de las algas verdes, generalmente, habitan en ambientes continentales. Agrupan organismos unicelulares entre los que se destaca al género *Comasiella*: organismos coloniales de vida libre, reconocidos por presentar células alargadas con bordes curvos, que agrupan entre dos y 16 células colocadas de manera secuencial (Guiry y Guiry, 2013). Presentan un único cloroplasto en la célula y el pirenoide suele presentarse en la zona central. Su presencia en el ecosistema fitoplanctónico es abundante, pero también habitan en el perifiton e incluso proliferan en aguas eutróficas (Hegewald et al., 2010; Ramos et al., 2015). La presencia de *Comasiella* en ambientes acuáticos no representa toxicidad para los organismos que la rodean. Su importancia se refleja en el ámbito de la acuicultura, donde asegura un ambiente apto para el desarrollo de *Oreochromis*

*niloticus* (Tilapia), por ejemplo (Guerrero et al., 2015; Bicudo y Menezes, 2006; Esqueda-Lara, 2016).

En este estudio, el crecimiento de *Comasiella arcuata* fue especialmente evidente en medio BBM, fotoperiodo 12:12, pH 7-9 y aireación. Su fase estacionaria se prolongó desde el día 9 hasta el día 21 y presentó fluctuaciones durante el periodo de experimentación. Se adaptó tanto al fotoperiodo y como al pH 7-9 proporcionados en el laboratorio y los nutrientes facilitados por los medios de cultivo fueron adecuados para mantener densidades celulares relativamente altas. Cabe mencionar que no existen publicaciones de su cultivo *in vitro*. No obstante, su bajo número poblacional en el ecosistema natural es indicio de baja contaminación eutrófica (Hegewald et al., 2010).

*Staurastrum chaetoceras* fue el taxón más conspicuo de todos, con diferencia. Se presenta como células solitarias en hábitats planctónicos. Son sensibles a cambios ambientales. El género *Staurastrum* suele presentarse en ambientes con pH ácido e, incluso, puede crecer en presencia de contaminación eutrófica y en ambientes con bajo contenido de calcio y magnesio. Su población puede disminuir ante altas concentraciones de fósforo (Loaiza et al., 2011; Canosa y Pinilla, 2006; Sarmiento, 2017).

En este ensayo, los cultivos en medio BBM permitieron una mejor adaptación de *S. chaetoceras* en periodos cortos, pero presentó fluctuaciones durante la fase exponencial, misma que se mantuvo durante 1-2 días. Los nutrientes calcio y magnesio estuvieron presentes como cloruro de calcio dihidratado (15.10 g/L) y sulfato de magnesio heptahidratado (0.5 g/L), soluciones en concentraciones ligeramente altas, pero asimilables. En cambio, en el medio Nitrofoska, esta especie presentó una fase de latencia prolongada y un crecimiento exponencial sin fluctuaciones hasta el día 24 de experimentación. Esto pudo deberse a la baja concentración de óxido de fósforo (V) del 10%. Se registraron poblaciones elevadas en aireación donde su crecimiento tan diverso se asoció a la presencia de nutrientes limitados tanto en BBM como en Nitrofoska. La mayor densidad poblacional correspondió al medio Nitrofoska con  $4444 \pm 0.10 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$ .

La microalga *Chlorococcum* se presenta en grupos temporales y en solitario. Su tamaño es variable y su forma puede ser esférica o elipsoidal (Guiry y Guiry, 2023). Se presenta en ambientes eutróficos y su crecimiento puede estar relacionado con coloraciones verdes en el cuerpo de agua. El crecimiento del género está relacionado con la cantidad de nitrógeno y la aireación continua. En cultivo monoalgal, puede crecer en pH de 5 a 9 bajo un régimen de

luz:oscuridad de 12:12 para la producción de carotenoides, principal razón de su cultivo industrial (Lui y Lee, 2000). En medio sólido, se aprecian colonias de color verde oliva semiesféricas (Carvajal et al., 2013).

El medio BBM líquido favoreció el cultivo de *Chlorococcum* sp. a pesar del bajo contenido de nitrógeno. Cabe señalar que su composición nutricional aparte del nitrógeno es fósforo, potasio, magnesio, calcio, sulfatos, hierro, entre otros, que influye en el crecimiento exponencial de esta microalga hasta el día 17 en un periodo de experimentación de 24 días (Carvajal et al., 2013). En este ensayo, su mejor crecimiento se visualizó en BBM bajo fotoperiodo 18:6, pH 5-6 y aireación, en el que el taxón alcanzó la mayor población algal del experimento con  $2010 \pm 18.04 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Según Carvajal (2013), tanto el medio BBM como el BG11 estimulan el crecimiento de la microalga en cultivo monoalgal. La cantidad de nitrógeno disponible en el medio de cultivo BBM se presenta como nitrato de sodio (25 g/L) y nitrato de cobalto hexahidratado (0.49 g/L), en concentraciones bajas. La escasa presencia de la microalga en el fertilizante Nitrofoska pudo estar relacionado con la falta de los otros elementos esenciales que sí proporciona el medio BBM.

En resumen, *Comasiella* sp., *Staurastrum chaetoceras* y *Chlorococcum* sp. fueron las microalgas que más prevalecieron en los medios de cultivo y condiciones de incubación proporcionadas, sobre todo por la tolerancia de estas microalgas a grandes rangos de concentración de nutrientes, contaminación eutrófica y pH relativamente bajo. Esto les permitió no solo aprovechar adecuadamente los nutrientes proporcionados, sino alcanzar altas densidades poblacionales y prologadas fases de crecimiento exponencial. No obstante, existen aspectos adicionales interesantes que conviene destacar.

En primer lugar, a los géneros microalgales *Oocystis*, *Octacanthium*, *Sphaerocystis*, *Cosmarium*, *Dinobryon* y *Comasiella* no se les ha encontrado un particular interés en el ámbito industrial como para hallar mayores referencias que hagan énfasis en su cultivo masivo o mejores condiciones de incubación. No obstante, su presencia o ausencia en los diferentes ecosistemas acuáticos puede ser determinante para la calidad de agua. Por ello, es interesante comprobar cómo reaccionan en cultivos mixtos en un laboratorio y examinar su reacción ante condiciones que pueden llegar a considerarse hostiles para la mayor parte de organismos microscópicos.

En segunda instancia, conviene recalcar que, en los ambientes lénticos eutróficos con alto contenido de calcio, suelen predominar varias especies microalgales donde resalta el género

*Staurastrum* mientras que, en cuerpos de agua con concentración de calcio baja, el ecosistema se encuentra dominado por diatomeas (Gómez, 2007). En el presente estudio, *S. chaetoceras* creció en la mayoría de tratamientos, salvo en aquellos en medio BBM, pH 5-6, en ambos fotoperiodos, con y sin aireación. Así pues, durante el periodo de ejecución del ensayo, el efecto del contenido de calcio pudo evaluarse a través del medio BBM, pues este elemento estuvo presente en concentraciones ligeramente altas, sin alcanzar un ambiente eutrófico, condiciones que permitieron el crecimiento de microalgas pertenecientes a las divisiones Chlorophyta y Charophyta.

### **Parámetros evaluados y su incidencia en el crecimiento algal**

Los medios de cultivo pueden tener variaciones en el pH durante el tiempo de experimentación. Esto limita el riesgo de contaminaciones de origen bacteriano. Además, puede reducir la diversidad de taxones comparada con la de la muestra fitoplanctónica de origen. Por otra parte, el pH se vincula a varios factores como productividad, respiración, alcalinidad, iones y dióxido de carbono en el medio de cultivo, debido a que se desarrollarían mejor bajo rangos de pH diferenciados en función de la fisiología propia de cada especie, pero se considera como óptimo el pH 7-9 (Pérez y Labbé, 2014; Bennouna, 2022). Los medios de cultivo BBM y Nitrofoska fueron sometidos a cambios de pH donde los rangos 5-6 y 7-9 se relacionan con necesidades de producción masiva (Beltrán-Rocha et al., 2017). En este estudio, el pH 5-6 permitió un crecimiento mayoritario de *Staurastrum chaetoceras*, pero su aplicación en laboratorio tiene su explicación si se extrapola al ambiente natural.

Las aguas superficiales naturales tienen un rango de pH de 6.5 - 8.0 en base a la presencia de soluciones de carbonato y bicarbonato que evitan posibles cambios de pH. Por otro lado, el pH 5-6 se origina por la concentración de materia orgánica natural. En los ríos, se mantiene un amplio rango de pH por la presencia de iones bicarbonato que se mezclan en el ambiente acuático por la fragmentación de rocas. Los diversos cambios del pH pueden estar asociados a las prácticas agrícolas que emiten lixiviados hacia el subsuelo, como nitratos, cloruros, sulfatos y algunos bicarbonatos, y también elementos como calcio, magnesio y potasio. Esto provoca un exceso de iones de hidrógeno en la superficie del suelo que después serán transportados por el flujo de agua. La acidificación del medio acuático está asociada con la presencia de aluminio proveniente de un lixiviado y, al combinarse con aguas eutróficas, da como resultado un pH 5-6 (Albrecht, 2020). Entonces, en este ensayo el pH 5-6, sobre todo en medio Nitrofoska, un fertilizante de uso agrícola, utilizado en cultivos mixtos genera un ambiente eutrófico que

permite el crecimiento de *Staurastrum chaetoceras*. No obstante, el pH no es el único parámetro ambiental que conviene controlar.

El fotoperiodo, por ejemplo, tiene incidencia en actividades metabólicas de organismos microalgales tanto en condiciones medioambientales como de experimentación en laboratorio. Según Humprey (1979), los diferentes grupos microalgales reaccionan de manera desigual ante niveles diferentes de luz. La iluminación constante no permite tasas de crecimiento elevadas, sino que conlleva al desarrollo de fotoinhibición. Brindar un régimen de luz:oscuridad beneficia el crecimiento, producción de carotenoides, clorofila, asimilación de nutrientes, entre otros (Price et al., 1998; Villa et al., 2014; Beltrán-Rocha et al., 2017). En este estudio, se plantearon dos fotoperiodos, 12:12 para simular condiciones naturales y 18:6 para aumentar la intensidad lumínica sin llegar a generar un exceso de radiación y evitar la muerte celular. En efecto, únicamente el fotoperiodo 18:6, pH 5-6 en medio Nitrofoska permitió un crecimiento microalgal prolongado de *Staurastrum chaetoceras*, mientras que en fotoperiodo 12:12 este taxón presentó fluctuaciones únicamente en pH 5-6 y 9-11 en presencia y ausencia de aireación durante el experimento. No obstante, las fluctuaciones poblacionales también pueden deberse a otro parámetro adicional.

En efecto, la acumulación de nutrientes genera un impacto en la calidad del agua denominado eutrofización, donde la población microalgal se desarrolla a gran escala. La generación de este ambiente en la naturaleza se debe a la presencia de restos de malezas acuáticas que se descomponen y reducen la presencia de oxígeno en el cuerpo de agua (Albrecht, 2020). La experimentación *in vitro* bajo parámetros establecidos permite profundizar en la diversidad fitoplanctónica endémica de ambientes lénticos y su susceptibilidad o adaptabilidad a fluctuaciones ambientales: se puede examinar qué parámetros ambientales y bajo qué niveles o combinaciones se obtienen determinadas respuestas. Esto proporciona una aproximación a lo que podría estar sucediendo en el ambiente o provocarse si las condiciones ambientales cambian (Santaella-Álvarez, 2013; Martí, 2007; Hernández-Pérez y Labbé, 2014). La biomasa microalgal agrupa variedad de especies, donde su presencia y abundancia resulta fundamental para la calidad de agua. Cada organismo se desarrollará en función de la sensibilidad o tolerancia al hábitat donde se encuentre y, al ser susceptible, llega a ser considerado como organismo bioindicador.

Precisamente, las microalgas se cuentan individualmente y/o en conjunto entre los bioindicadores más importantes de la calidad de ecosistemas acuáticos (Albrecht, 2020). En

ese sentido, de acuerdo a los resultados obtenidos en este experimento, podría considerarse como taxones bioindicadores de eutrofización a *Trachelomonas volvocina* y *Coelastrum* sp., condiciones que no pudieron ser simuladas en el laboratorio. Por otro lado, el crecimiento de *Oocystis lacustris*, *Dinobryon divergens* y *Staurastrum chaetoceras* podría ser indicador de bajo contenido de fósforo. Un aporte de nitratos en el medio podría significar la proliferación de *Octacanthium octocorne*, y *Botryococcus braunii*. *Sphaerocystis* sp. podría ser considerado bioindicador de tendencia a eutrofización y acidez. En cambio, si bien un bajo número poblacional de *C. arcuata* puede ser indicio de baja contaminación eutrófica y *Chlorococcum* sp. es característico de ambientes naturales eutróficos, *Comasiella arcuata*, *Staurastrum chaetoceras* y *Chlorococcum* sp. demostraron su plasticidad y adaptabilidad a condiciones cambiantes, que los hicieron predominar en los diferentes cultivos. La ventaja es que ninguno de estos taxones representa un peligro de toxicidad para el ecosistema, aunque lleguen a proliferar masivamente. Por tanto, este ensayo demuestra, de forma indirecta, la importancia de la carga de nutrientes en el crecimiento de microorganismos fotosintéticos en el laboratorio: un parámetro que debería evaluarse más de cerca, sobre todo por sus implicaciones para el ambiente natural.

Sin embargo, no solo la carga de nutrientes se quedó por fuera de los parámetros ambientales analizados directamente en este ensayo. Se crea conveniente examinar de cerca éste y otros parámetros ambientales, sobre todo, por su importancia de cara a la reacción de los organismos fitoplanctónicos en el contexto de calentamiento global. De hecho, se considera fundamental examinar también qué puede suceder si lo que se ve alterado en el medio natural es la temperatura y la intensidad lumínica, además de la carga de nutrientes, debido al cambio climático. Además, se recalca la importancia de identificar aquellos taxones bioindicadores de cambios sustanciales en la comunidad planctónica como producto de las fluctuaciones ambientales en el marco de calentamiento global en Ecuador.

En cualquier caso, si lo que se busca es maximizar el crecimiento de microorganismos fitoplanctónicos en cultivo, las condiciones más idóneas que se desprenden de este trabajo son: medio de cultivo BBM, pH 7-9, fotoperiodo 18:6 y aireación.

## CONCLUSIONES

La supervivencia de los diferentes taxones a las condiciones de incubación fue diferencial. Los taxones *Coelastrum* sp. y *Trachelomonas volvocina* fueron los más sensibles, con diferencia,

puesto que no se proveyeron condiciones propias de los ambientes eutróficos que los caracterizan.

El crecimiento de la mayoría de taxones se vio influenciado por las concentraciones de nutrientes proporcionadas por los medios de cultivo evaluados. Esto justificó la presencia discreta de *Oocystis lacustris*, *Octacanthium octocorne*, *Dinobryon divergens*, *Botryococcus braunii*, *Sphaerocystis* sp. y *Cosmarium* sp.

*Oocystis lacustris* y *Dinobryon divergens* requirieron de menos fósforo, mientras que *Sphaerocystis* sp. necesitaba todavía más. *Octacanthium octocorne* esperaba más nitrógeno. *Botryococcus braunii* careció de citrato férrico y nitrato de potasio y requirió de más nitrógeno. *Cosmarium* sp. necesitaba de potasio, magnesio y sodio en concentraciones superiores.

La microalga *O. lacustris* se desarrolló tanto en el medio BBM como en Nitrofoska, pero *D. divergens* únicamente creció en medio BBM donde su supervivencia dependió de microorganismos reductores de fosfatos. *Octacanthium octocorne*, *Sphaerocystis* sp. y *Staurastrum chaetoceras* se desarrollaron en medio Nitrofoska, mientras que en el medio BBM puso a disposición concentraciones bajas de nitrógeno con las que *Sphaerocystis* sp. no se desarrolló y su crecimiento se vio afectado, además, por la ausencia de *Chlorella* sp., *Closteriopsis* sp. y/o la cianobacteria *Microsystis* sp.

El crecimiento poblacional fue variado en ambos medios de cultivo. En BBM, se evidenció una fase de adaptación corta para todos los taxones, pero los organismos fotosintéticos *Comasiella arcuata*, *Staurastrum chaetocera* y *Chlorococcum* sp. dominaron el ecosistema por su crecimiento exponencial conspicuo. *Comasiella arcuata* creció en condiciones de cultivo similares a su ecosistema natural. El crecimiento de *Chlorococcum* sp. y *S. chaetoceras* fue elevado en los diferentes medios de cultivo, se desarrollaron también en el régimen de más horas de luz, en presencia de aireación, pero a diferente pH. No obstante únicamente *S. chaetoceras* se adaptó en Nitrofoska .

En resumen, el mejor medio de cultivo resultó BBM, el pH más idóneo el 7-9, el fotoperiodo más adecuado 18:6 y la presencia de aireación, pues fueron las condiciones que ayudaron al cultivo de la mayor parte de taxones fitoplanctónicos provenientes del medio natural.

Finalmente, pueden hacerse ciertas puntualizaciones con respecto al poder bioindicador de la carga de nutrientes a partir del crecimiento de la mayoría de taxones implicados en este trabajo: *Trachelomonas volvocina* y *Coelastrum* sp. sería indicadores de eutrofización, *Oocystis lacustris*, *Dinobryon divergens* y *Staurastrum chaetoceras* indicarían bajo contenido de fósforo, un mayor aporte de nitratos podría ayudar a la proliferación de *Octacanthium octocorne*, y *Botryococcus braunii*., mientras que *Sphaerocystis* sp. podría indicar tendencia a eutrofización y a la acidez.. No obstante, queda por delante evaluar no solo el efecto directo de los nutrientes, sino también el de la temperatura y la intensidad de luz, como *proxi* a lo que pudiera suceder con el cambio climático global.

### REFERENCIAS

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo Paredes, P., Torres, E. y Herrero, C. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. *Universidade da Coruña*.  
<https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Albrecht, M. (2020). Diversidad fitoplanctónica como indicador de calidad de agua en subembalses de la represa de Yacyretá, departamento Itapúa, Paraguay. [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad Nacional de Itapúa.
- Andersen, R. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier.
- Andrade, C., Vera, A., Cárdenas, C. y Morales, E. (2009). Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 126-134.
- Ansilago, M. (2021). *Bioprospecção de microalgas para aplicação biotecnológica*. [Tesis de doctorado no publicada]. Universidade Federal da Grande Dourados.
- Arcos-Pulido, M. y Gómez, A. (2006). Microalgas perifíticas como indicadores del estado de las aguas de un humedal urbano: Jaboque, Bogotá D.C., Colombia. *Nova*, 4(6), 1-114.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis. Recuperado de <https://www.google.com.ec/books/edition/Algae/DkvLBOAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1>
- Beltrán-Rocha, J., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. y López-Chuken, U. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto de

- pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 417-427. DOI:10.4067/S0718-19572017000300001
- Bennouna, C. (08 de junio de 2022). *Los diferentes medios de cultivo para microalgas*. Synoxis algae. Recuperado de <https://www.synoxis-algae.com/los-diferentes-medios-de-cultivo-para-microalgas/>
- Bicudo, C. y Menezes, M. (2006). *Géneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. [https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Bicudo/publication/272563598\\_Generos\\_de\\_Algas\\_de\\_Aguas\\_Continentais\\_do\\_Brasil\\_chave\\_para\\_identificacao\\_e\\_descricoes/links/609bb5cc299bf10fbb0ba113/Generos-de-Algas-de-Aguas-Continentais-do-Brasil-chave-para-identificacao-e-descricoes.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Bicudo/publication/272563598_Generos_de_Algas_de_Aguas_Continentais_do_Brasil_chave_para_identificacao_e_descricoes/links/609bb5cc299bf10fbb0ba113/Generos-de-Algas-de-Aguas-Continentais-do-Brasil-chave-para-identificacao-e-descricoes.pdf)
- Bicudo, C., Faustino, S., Godinho, L. y Oliveira, M. (2007). Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 24: Zygnemaphyceae (Desmidiaceae: Octacanthium, Staurastrum e Staurodesmus). *Hoehnea* 34(4), 497-517. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/S2236-89062007000400006>
- Blandón, R. (2017). Capacidad de remoción de las algas clorofitas en condiciones críticas de nutrientes en aguas residuales de filtros percoladores. *Agua Saneamiento y Ambiente*, 12(1), 46-52. Recuperado de <https://revistas.usac.edu.gt/index.php/asa/article/view/1430/903>
- Bold, H. C. (1942). The Cultivation of Algae. *Botanical Review*, 8(2), 69–138. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/4353264>
- Bonnisonne, E., Vicente, P., Herrera, R., Sáez, S. y Tereschuk, M. (2023). Biomass production of microalgae and scale-up design of high rate algal ponds for citrus industry effluent tertiary treatment, Tucumán, Argentina. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 8, 1-8.
- Brito, D., Milani, N., Pereira, G., González, M. y Morán, R. (2006). Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. *Ciencia*, 14(4), 397-410. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/9505/9492>

- Broady, P. (2007). Six new species of terrestrial algae from Signy Island, South Orkney Islands, Antarctica. *British Phycological Journal*, 11(4), 387-405. <https://doi.org/10.1080/00071617600650451>
- Canosa, A. y Pinilla, G. (2007). Relaciones entre las abundancias del bacterioplancton y del fitoplancton en tres ecosistemas lénticos de los Andes Colombianos. *Revista de Biología Tropical*, 55(1), 135-146. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v55n1/3613.pdf>
- Carvajal, A., Cadena, M., Molina, D., Romero, P., Gavilanez, F. y Morales, E. (2013). Cultivo de una cepa carotenogénica de *Chlorococcum* sp. (Chlorophyta: Chlorococcales) aislada de rizósfera de *Vicia faba* (haba). *Acta Botánica Venezuelica*, 36 (2), 309-324.
- Cruz, I., Sánchez, E., Ocampo, J., Castro, J., Monroy, M. y Castro, G. (2015). Tecnología para el cultivo de microalgas en interior y exterior. Propuestas prácticas para operar en granjas acuícolas de pequeña escala. *Revista Digital del Departamento el Hombre y su Ambiente*, 2(9), 31-42.
- Dayananda, C., Sarada, R., Bhattacharya, S. y Ravishankar, G. (2005). Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry*, 40, 3125-3131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.006>
- Devi, S. S. y Sahoo, D. (2015). Culturing Algae. *The Algae World* (p. 557). Springer.
- Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento. (2016). Proyecto Chalpi. Recuperado de [https://www.aguaquito.gob.ec/downloads/PChalpi/exposicion\\_realizada\\_a\\_oferentes\\_en\\_la\\_reunion\\_previa\\_a\\_la\\_licitacion.pdf](https://www.aguaquito.gob.ec/downloads/PChalpi/exposicion_realizada_a_oferentes_en_la_reunion_previa_a_la_licitacion.pdf)
- Esqueda-Lara, K., Sánchez, A., Valdés-Lagunes, G., Salcedo, M., Franco-Torres, A. y Florido, R. (2016). Fitoplancton en el humedal tropical Chaschoc en la cuenca baja del río Usumacinta. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 1177-1188. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.10.015>
- Faustino, S. y Bicudo, C. (2003). Genus *Octacanthium* (Zygnemaphyceae, Desmidiaceae) in the state of São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*, 3(1), 2-7. <https://www.scielo.br/j/bn/a/NdqxG6c4tkbBNZZq8NKMhbH/?lang=en&format=pdf>
- Forján, E., Navarro, F., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ruíz-Domínguez, M., Gojkovic, Z., Vázquez, M., Márquez, M., Mogedas, B., Bermejo, E., Girlich, S., Domínguez, M.,

- Vílchez, C., Vega, J. y Garbayo, I. (2014). Microalgae: fast-growth sustainable green factories. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(16), 1705–1755. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.966426>
- Galarza, V. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>
- García, A. (1994). Charophyta: their use in paleomnology. *Journal of Paleolimnology*, 10, 43-52. <https://doi.org/10.1007/BF00683145>
- García, A. (1994). Charophyta: their use in paleomnology. *Journal of Paleolimnology*, 10, 43-52. <https://doi.org/10.1007/BF00683145>
- Garduño-Solórzano, G., Rodríguez-Palacio, M., Martínez-García, M., Quintanar-Zúñiga, R., Lozano-Ramírez, C., Campos-Contreras, J. y Monsalvo-Reyes, A. (2011). Cultivos de microalgas del Lago de Catemaco, Veracruz. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 2(2), 67-80.
- Giani, A. y Delgado, P. (1988). Growth dynamics and competitive ability of a green (*Oocystis lacustris*) and a blue-green alga (*Synechocystis sp.*) under different N: P ratios. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 26, 1693-1697. <https://doi.org/10.1080/03680770.1995.11901020>
- Gómez, L. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19(2), 3-20. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>
- Gómez, L., Larduet, Y. y Abrahantes, N. (2001). Contaminación y biodiversidad en ecosistemas acuáticos. El fitoplancton de la bahía de Santiago de Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*, 22(3), 191-197.
- Gómez-Luna, L., Ortega-Díaz, Y. y Tormos-Cedeño, L. (2021). Efecto del pH sobre el crecimiento y viabilidad celular de una cepa local de *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Tecnología Química*, 41(2), 252-276.
- Grambast, L. (1974). Phylogeny of the Charophyta. *Taxon*, 23(4), 463-481. <https://doi.org/10.2307/1218769>

- Grambast, L. (1974). Phylogeny of the Charophyta. *Taxon*, 23(4), 463-481. <https://doi.org/10.2307/1218769>
- Guamán, M. y González, N. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador*. Corporación para la Investigación Energética, Laboratorio de Biotecnología Energética.
- Guerrero, P. y Pozo, A. (2013). *Evaluación del rol de la iluminancia, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga Scenedesmus sp. en condiciones de laboratorio*. [Tesis de grado no publicada]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Guiry, M y Guiry, G. (2013). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, Universidad Nacional de Irlanda, Galway, Irlanda. Recuperado de <https://www.algaebase.org>; buscado el 1 de noviembre de 2023.
- Guiry, M y Guiry, G. (2023). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, Universidad Nacional de Irlanda, Galway, Irlanda. Recuperado de <https://www.algaebase.org>; buscado el 7 de noviembre de 2023.
- Guiry, M. y Guiry, G. (2022). *AlgaeBase*. Publicación electrónica mundial. Universidad Nacional de Irlanda, Galway, Irlanda. Recuperado de <https://www.algaebase.org>.
- Hegewald, E., Wolf, M., Keller, A., Friedl, T. y Krienitz, L. (2010). ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. *Phycology*, 49(4), 325-335. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1969.tb02581.x>
- Hernández-Pérez, A. y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. DOI: 10.4067/S0718-19572014000200001
- Indrayani, I., Egeland, E., Moheimani, N. y Borowitzka, M. (2022). Carotenoid production of *Botryococcus braunii* CCAP 807/2 under different growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, 34, 1177-1188. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-022-02682-6>
- Jácome-Pilco, C., Ballesteros, C., Rea, E. y Cayambe, L. (2021). Microalgas en el tratamiento de aguas residuales generadas en industrias de curtiembres. *Ciencia y Tecnología*, 14(2), 47-55.

- Jiang, X., Chen, X., Pang, W. y Wang, Q. (2022). Phylogeny of *Trachelomonas* and *Strombomonas* (Euglenaceae) Based on Morphological and Molecular Data. *Diversity*, *14*(8), 1-12.
- Lee, R. (1999). Evolution of two membranes of chloroplast endoplasmic reticulum. *Phycology* (pp. 365-388). Cambridge University.
- Liang, H., Wang, H., Xu, Y., Linzhou, L., Melkonian, B., Lorenz, M., Friedl, T., Sahu, S., Yu, J., Liu, H., Melkonian, M. y Wang, S. (2020). The Draft Genome of *Coelastrum proboscideum* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Protist* *171*, 1-17. DOI: 10.1016/j.protis.2020.125758
- Lloyd, C., Tan, K. y Lim, K. (2021). Identification of microalgae cultured in Bold's Basal medium from freshwater samples, from a high-rise city. *Scientific Reports* *11*, 4474. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84112-0>
- Loaiza, A., Ramírez, J., Echenique, R., Vallejo, A. y Ortiz, M. (2011). Dinámica espacio-temporal de cuatro especies de *Staurastrum* (Meyen 1829, emend. Ralfs 1848) en un embalse eutrófico colombiano. *Oecología Australis*, *15*(3), 726-746. <https://doi.org/10.4257/oeco.2011.1503.22>
- Loaiza, A., Restrepo, J., Echenique, R., Vallejo, A. y Ortiz, L. (2011). Dinámica espacio-temporal de cuatro especies de *Staurastrum* (Meyen 1829, emend. Ralfs 1848) en un embalse eutrófico colombiano. *Oecología Australis*, *15*(3), 726-746.
- López, K., Ontaneda, D. y Astorga, D. (2018). *Atlas de microalgas y cianobacterias*. Centro de Publicaciones PUCE.
- López, K., Ontaneda, D. y Astorga, D. (2019). *Atlas de microalgas y cianobacterias Embalse Salve Faccha*. Centro de Publicaciones PUCE.
- López, S. y Barrientos, R. (2005). *La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán*. Yucatán, México: Ediciones de la Universidad de Yucatán.
- Lui, B. y Lee, Y. (2000). Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*, *12*, 301-307. <https://doi.org/10.1023/A:1008185212724>
- Martí, M. (2007). Principios de ecotoxicología diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. *Editorial Tébar*.

[https://books.google.com.ec/books?id=86oL\\_Ybnwn8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=true](https://books.google.com.ec/books?id=86oL_Ybnwn8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true)

- Martínez, A. (2021). *Las microalgas y la salud en la actualidad, una revisión bibliográfica*. [Tesis de maestría no publicada]. Universitat Oberta de Catalunya.
- Martínez, C., Catalán, V. y Sevilla, J. (2004). *¡Agua!*. This One. [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=p1jYCAi0QucC&oi=fnd&pg=PA17&dq=Mart%C3%ADnez,+C.,+Catal%C3%A1n,+V.+y+Sevilla,+J.+\(2004\).+%C2%A1Agua!+Espa%C3%B1a:+This+One.&ots=zcjSEyRp9c&sig=kfsgJEpA-rS74Rp7ZMaBy4CMTJs#v=onepage&q&f=true](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=p1jYCAi0QucC&oi=fnd&pg=PA17&dq=Mart%C3%ADnez,+C.,+Catal%C3%A1n,+V.+y+Sevilla,+J.+(2004).+%C2%A1Agua!+Espa%C3%B1a:+This+One.&ots=zcjSEyRp9c&sig=kfsgJEpA-rS74Rp7ZMaBy4CMTJs#v=onepage&q&f=true)
- Morales, E. D., Luna, V, Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A. y Arévalo, A. (2013). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34(1-2), 129-149.
- Muñoz, M., Medina, V. y Cruz-Casallas, P. (2013). Effect of the photoperiod and food on productivity of two native cladocerans (*Moina* sp. and *Diaphanosoma* sp.) of the colombian Orinoquia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 16(1), 167-174.
- Núñez, M. (2008). *Microalgas acuáticas: La otra escala de la biodiversidad en la Amazonía colombiana*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.
- Oliva-Martínez, M., Godínez-Ortega, José., Zuñiga-Ramos, C. (2014). *Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(), 54–61. DOI:10.7550/rmb.32706
- Órpez, R., Martínez, M., Hodaifa, G., El Yousfi, F., Jbari, N. y Sánchez, S. (2009). Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Desalination*, 246,625-630. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.07.016>
- Perdomo, E., Pérez, M., Benítez, M. y Ruiz, C. (2018). Los detritos en el proceso de cicatrización y su eliminación para una correcta preparación del lecho de la herida. *Gerokomos*, 29(3), 141-144.
- Pereira, C., De Giner, G., Troccoli-Ghinaglia, L., Hernández, V., Peña, C., Losada, R. y Vera, F. (2021). Comunidad fitoplanctónica en una playa de la costa central de Venezuela y

- su relación con variables ambientales en un ciclo anual. *Intropica*, 16(2). DOI: 10.21676/23897864.4009.
- Price, L., Yin, K. y Harrison, P. (1998). Influence of continuous light and L:D cycles on the growth and chemical composition of Prymnesiophyceae including coccolithophores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 222, 223-234. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00168-8)
- Ramos, G., Bicudo, C. y Moura, C. (2015). Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*, 42(3), 549-566. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-03/2015>
- Ramos, P., Miranda, Y., de Cárdenas, L., Ones, O., Milán, A., de Miguel, P. y Lombardi, A. (2016). Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. *Afinidad*, 73, 125-129.
- Rauytanapanit, M., Janchot, K., Kusolkumbot, P., Sirisattha, S., Waditee-Sirisattha, R. y Praneenararat, T. (2019). Nutrient Deprivation-Associated Changes in Green Microalga *Coelastrum* sp. TISTR 9501RE Enhanced Potent Antioxidant Carotenoids. *Marine Drugs*, 17(6), 1-12. <https://doi.org/10.3390/md17060328>
- Rey, T. (2021). *Evaluación del Efecto de la Aireación y el Fotoperiodo para la Obtención de Biomasa a Partir de la Microalga Chlorella vulgaris*. “Tesis de grado no publicada”, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Sahoo, D. y Seckbach, J. (2015). *The Algae World*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7321-8>
- Sampieri, R., Fernández, C. y Baptista, L. (2014). *Metodología de la Investigación (6ª ed.)*. D.F. México: McGRAW-HILL.
- Santaella-Álvarez, E. (2013). *Proyecto Microalgas producción y desarrollo de cultivo de algas para la captación de anhídrido carbónico y la producción de biocombustibles resumen de los resultados y conclusiones*. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/313223/1/ProyMicroalgResu.pdf>

- Sarmiento Morales, M. (2017). *Microalgas como indicadores biológicos del estado trófico de las ciénagas de Malambo y Santo Tomás, en el departamento del atlántico* [Tesis de Maestría no publicada]. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Sarmiento, M. (2017). *Microalgas como indicadores biológicos del estado trófico de las ciénagas de malambo y Santo Tomás, en el departamento del atlántico*. [Tesis de maestría no publicada]. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Souza, D. y Felisberto, S. (2013). *Comasiella, Desmodesmus, Pectinodesmus e Scenedesmus* na comunidade perifítica em ecossistema lêntico tropical, Brasil Central. *Hoehnea*, 41(1), 109-120. Recuperado de <https://www.scielo.br/j/hoehnea/a/Yh6Vt4QVQ6q79TBX3897NhK/?format=pdf&lang=pt>
- Stoyneva, M., Cocquyt, C., Gartner, G. y Vyverman, W. (2007). *Oocystis lacustris* CHOD. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) in Lake Tanganyika (Africa). *Linzer biologische Beiträge*, 39(1), 571-632. <http://doi.org/10.5281/zenodo.5411020>
- Torres, A. y Mora, E. (2010). Isolation and characterization of potentially toxic or harmful cyanobacteria from Oaxaca and Chiapas, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health*. 45(1), 128-136. DOI: 10.1080/10934520903388483
- Verdugo, K. (2016). *Cultivo discontinuo de la microalga Coenochloris sp. con fracción soluble de papa (Solanum phureja) en condiciones mixotróficas*. [Tesis de grado no publicada]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Villa, A., Herazo, D. y Torregroza, A. (2014). Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (Clon C-Cal) en cultivos estáticos. *Revista Intropica*, 9, 111-117. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5111593>
- Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yang, W. y Shen, G. (2011). Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass & Bioenergy*, 35(5), 1710-1715. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.002>