



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE**  
**CIANOBACTERIAS DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS LEGUMINOSAS**  
**CULTIVADAS EN LA PARROQUIA POALÓ, LATACUNGA –**  
**COTOPAXI.**

Nombre:

**Raquel Estefanía Martínez Pérez**

Director:

**Dr. Ever Morales**

**Quito, 2014**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Raquel Estefanía Martínez Pérez, CI 0502999535, autora del trabajo de graduación titulado “AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CIANOBACTERIAS DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS LEGUMINOSAS CULTIVADAS EN LA PARROQUIA POALÓ, LATACUNGA – COTOPAXI”, previo a la obtención de grado académico de LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA en la Escuela de Bioanálisis.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENECYT en forma digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 24 de Febrero del 2014



Raquel Estefanía Martínez Pérez

CI: 0502999535

## DEDICATORIA

*A Dios, por su amor desde antes de nacer.*

*A Raúl y Pilar, como padres, los mejores.*

*A mis hermanos y sobrino sin cuyo amor y apoyo este trabajo todavía seguiría inconcluso.*

*A Pablo Andrés por su amor incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

*Mi mayor agradecimiento es para el Señor, el amante que he anhelado toda mi vida. Gracias por revelarte a mí, por confiarme una misión y por permitirme cumplir los sueños más hermosos que Tú mismo ya soñaste para mí.*

*A mis amados padres, gracias por su ejemplo, disciplina, paciencia, oraciones y amor. Ustedes han sido siempre el viento bajo mis alas, tuve mucha suerte de tenerlos como padres, pero más suerte aún de que sean mis amigos.*

*A mi hermana Lore, gracias por tu amor, tu ejemplo y por la alegría que me das siempre cuando llego a casa.*

*A mi hermano Raúl, gracias por ser el compañero de mi vida, mi mejor amigo, el bastón en el que me apoyo siempre en cada paso.*

*A mi sobrinito Andrés, gracias por tu amor, tu dulzura y sonrisa que siempre me inspiran a ser el mejor de los ejemplos para ti.*

*A mi director de disertación, maestro y amigo Ever, gracias por su apoyo incondicional, por su confianza y amistad de siempre, mi eterno agradecimiento hacia usted.*

*A Pablo Andrés, gracias por tu obediencia a Dios, por tu apoyo, por tus oraciones y por tu amor.*

*A mis amigos Nadi, Augusto, Emi, José, Santy, Pame, Michelle, Kari, Blito, Nacho, Marivi y Marcos gracias por su hermandad, su amistad, sus oraciones y amor.*

*A mis hermanas de grupo pastoral Amparito, Pame, Eve y Kori, gracias por sus oraciones y por ser el lugar en donde vivo a plenitud la comunidad.*

*A las autoridades y personal docente de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de manera especial a Sandra Andrade, Lucía Ulloa y Josefina Egas, gracias por la apertura y el apoyo permanente para la realización de este trabajo.*

*A las autoridades de la Unidad de Biología, Centro de Ciencias, Universidad Central del Ecuador, gracias por facilitarme las instalaciones del laboratorio para la realización de este trabajo.*

*A mis asesores Jeniffer Yáñez, Marco Gudiño y Martín Marcial gracias por su interés genuino, soporte académico y colaboración para el desarrollo de este trabajo.*

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN</b> .....	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>INDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>v</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Objetivos de la investigación .....	3
1.1.1 Objetivo General: .....	3
1.1.2 Objetivos Específicos:.....	3
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>4</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1 Antecedentes .....	4
2.2 Microorganismos utilizados como biofertilizantes ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.3 Cianobacterias .....	6
2.3.1 Características morfológicas .....	7
2.3.2 Células especializadas en cianobacterias .....	8
2.3.3 Ecología y fisiología de las cianobacterias .....	9
2.4. Aplicaciones de las Cianobacterias .....	10
2.4.1 Producción de hidrógeno.....	10
2.4.2 Tratamiento de aguas residuales .....	11
2.4.3 Uso de biomasa de cianobacterias como complemento alimenticio humano y animal .....	11
2.4.4 Producción de metabolitos con valor económico.....	12
2.4.5 Cianobacterias como biofertilizantes .....	13
2.5. Cianobacterias fijadoras de nitrógeno .....	10

2.5.1 <i>Nostoc</i> y <i>Anabaena</i> .....	15
2.5.2 Ubicación taxonómica de las Cianobacterias <i>Nostoc</i> y <i>Anabaena</i> .....	17
2.6. Fijación de nitrógeno .....	10
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>22</b>
<b>MARCO METOLÓGICO.....</b>	<b>22</b>
3.1. Materiales.....	22
3.1.1. Materiales para muestreo de suelos.....	22
3.1.2. Materiales para laboratorio .....	22
3.1.3. Equipos de laboratorio .....	23
3.1.4. Medios de cultivo y reactivos .....	23
3.2. Ámbito de estudio .....	24
3.3. Muestreo de suelos y raíces .....	24
3.4. Preparación de medios de cultivo .....	24
3.4.1 Medio de cultivo Nitrofoska .....	24
3.4.2 Medio de cultivo <b>BG 110</b> -.....	25
3.5. Obtención de cianobacterias .....	26
3.6. Aislamiento de cianobacterias .....	26
3.6.1 Producción de biomasa de las cianobacterias .....	27
3.7. Monitoreo de la producción de los consorcios de cianobacterias.....	31
3.7.1 Determinación de turbidez de los consorcios.....	31
3.7.2 Cuantificación de pigmentos liposolubles .....	31
3.7.3 Cuantificación de compuestos hidrosolubles .....	32
3.7.4 Irradiación .....	32
3.7.5 Salinidad.....	33
3.7.6 pH.....	34
3.7.7 Temperatura .....	34
3.7.8 Muestreo de suelo para análisis químico. ....	34
3.7.9 Preparación del sustrato .....	35
3.7.10 Preparación de los tratamientos .....	35
3.7.11 Preparación del inóculo del consorcio de cianobacterias.....	36
3.7.12 Preparación del fertilizante químico .....	36
3.7.13 Preparación del consorcio de cianobacterias + el fertilizante químico .....	37

3.8 Aplicación de tratamientos en el suelo .....	37
3.8 Evaluación de la viabilidad de los consorcios de cianobacterias.....	39
3.9 Análisis de datos .....	40
3.9.1 Viabilidad de las cianobacterias.....	40
3.9.2 Análisis químico del suelo .....	40
3.9.3 Análisis de plántulas en el suelo .....	41
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 Registro de microalgas y cianobacterias de suelos cultivados con plantas leguminosas (Latacunga- Cotopaxi – Ecuador).....	42
4.2 Consorcios de cianobacterias.....	44
4.2.1 Cianobacterias aisladas .....	44
4.2.2 Evaluación de las condiciones del consorcio de cianobacterias previa a su inoculación .....	44
4.3 Análisis de viabilidad de las cianobacterias en el suelo .....	46
4.4 Análisis químico del suelo.....	70
4.4.1 pH.....	71
4.4.2 Materia orgánica.....	71
4.4.3 Nitrógeno.....	72
4.4.4 Fósforo .....	743
4.4.5 Boro.....	74
4.4.6 Potasio .....	75
4.4.7 Calcio .....	76
4.4.8 Magnesio .....	758
4.4.9 Hierro .....	75
4.4.10 Manganeso .....	80
4.4.11 Cobre .....	876
4.4.12 Zinc .....	82
4.4.13 Azufre.....	84
4.5 Análisis de plántulas del suelo.....	85
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>89</b>

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>92</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>93</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía mediante la aproximación botánica del orden Nostocales (Komarék & Anagnostidis, 1999).....	18
Tabla 2. Composición de Nitrofoska foliar .....	25
Tabla 3. Composición del medio de cultivo BG-110. ....	25
Tabla 4. Tratamientos aplicados a suelo agrícola.....	35
Tabla 5. Distribución aleatoria de los tratamientos de estudio.....	37
Tabla 6. Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013). ....	40
Tabla 7. Registro de taxas de microalgas y cianobacterias asociadas en rizósfera de leguminosas. ....	42
Tabla 8. Microalgas y cianobacterias asociadas tanto en la rizósfera como raíces de leguminosas de acuerdo al tipo de planta. ....	43
Tabla 9. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día ocho.....	46
Tabla 10. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día quince.....	50
Tabla 11. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el veinte y dos.....	54
Tabla 12. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día veinte y nueve. ....	57
Tabla 13. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día treinta y seis. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 14. Microalgas y cianobacterias presentes en los tratamientos durante todo el período de estudio. MFNO: microorganismos fotosintéticos no observados.....	69
Tabla 15. Tabla ANOVA de los tratamientos.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 16. Media de materia orgánica de los diferentes tratamientos. ....	72
Tabla 17. Análisis de comparación múltiple de la materia orgánica de cada tratamiento. .	72
Tabla 18. Media de nitrógeno de los diferentes tratamientos.....	73
Tabla 19. Análisis de comparación múltiple de nitrógeno de cada tratamiento.....	73
Tabla 20. Especies de plantas que crecieron en los diferentes tratamientos. ....	78
Tabla 21. Tabla ANOVA de las plántulas que crecieron por cada tratamiento.....	79

Tabla 22. Media del número de plantas que crecieron por cada tratamiento.....	80
Tabla 23. Análisis de comparación múltiple del crecimiento de plantas de cada tratamiento.....	80

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cianobacterias filamentosas ramificadas con heterocistos. (A) Filamentos ramificados vistos a 40 X. (B) Heterocisto de un filamento ramificado visto a 100 X.....	15
Figura 2. <i>Anabaena</i> sp. con acinetos (40X). .....	17
Figura 3. Cepa de <i>Nostoc</i> sp. a 40X .....	18
Figura 4. Poblaciones de microalgas y cianobacterias asociadas a las muestras de raíces y rizósfera de leguminosas con medio de cultivo BG-110.....	26
Figura 5. Cepa de <i>Nostoc</i> spp. aislada en medio sólido BG-110.....	27
Figura 6. Sistema de cultivo discontinuo de las cianobacterias aisladas.....	28
Figura 7. Producción de biomasa de cianobacterias.....	29
Figura 8. Escalamiento de cultivo de cianobacterias a 6L. ....	29
Figura 9. Sistema de cultivo del consorcio de cianobacterias. ....	30
Figura 10. A. Consorcios de cianobacterias en estudio A, B y C. B. Monitoreo de irradiación de los consorcios. ....	33
Figura 11. Evaluación de la salinidad de los consorcios de cianobacterias. ....	33
Figura 12. Tamizado del suelo .....	35
Figura 13. Mezcla de los concentrados de los consorcios con gran cantidad de sobrenadante.. ....	36
Figura 14. Tratamientos de estudio. ....	38
Figura 15. Inoculo para tratamiento con consorcio de cianobacterias + fertilizante químico. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 16. Muestreo de la primera semana.....	39
Figura 17. A. Muestreo de la segunda semana. B. Muestreo de la tercera semana. C. Muestreo de la cuarta semana. D. Muestreo de la quinta semana. ....	39
Figura 18. Pigmentos liposolubles de los consorcios.....	45
Figura 19. Pigmentos hidrosolubles del consorcio.....	45
Figura 20. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día ocho. ....	47
Figura 21. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día ocho. ....	47
Figura 22. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día ocho. ....	48

Figura 23. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día ocho. ....	48
Figura 24. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día ocho. ....	49
Figura 25. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día ocho. ....	49
Figura 26. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día quince. ....	51
Figura 27. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día quince. ....	51
Figura 28. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día quince. ....	52
Figura 29. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día quince. ....	52
Figura 30. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día quince. ....	53
Figura 31. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día quince. ....	53
Figura 32. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día veinte y dos. ....	55
Figura 33. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día veinte y dos. ....	55
Figura 34. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día veinte y dos. ....	55
Figura 35. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día veinte y dos. ....	56
Figura 36. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día veinte y dos. ....	56
Figura 37. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día veinte y dos. ....	57
Figura 38. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE1 en el día veinte y nueve. ....	58
Figura 39. Microalgas presentes en el tratamiento TE2 en el día veinte y nueve. ....	58

Figura 39. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE3 en el día veinte y nueve.....	59
Figura 41. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día veinte y nueve.....	59
Figura 42. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día veinte y nueve.....	60
Figura 43. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día veinte y nueve.....	61
Figura 44. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día veinte y nueve.....	61
Figura 45. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día veinte y nueve.....	62
Figura 46. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día veinte y nueve.....	62
Figura 47. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE1 en el día treinta y seis.....	64
Figura 48. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE2 en el día treinta y seis.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 49. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE3 en el día treinta y seis.....	65
Figura 50. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día treinta y seis.....	65
Figura 51. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día treinta y seis.....	66
Figura 52. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día treinta y seis.....	66
Figura 53. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día treinta y seis.....	67
Figura 54. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día treinta y seis.....	<b>¡Error! Marcador no definido.7</b>
Figura 55. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día treinta y seis.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

Figura 56. A) Tratamientos con presencia de plántulas herbáceas en el día 22. B)	
Tratamientos con presencia de plántulas herbáceas en el día 36.....	85
Figura 57. Media del número de plantas en los diferentes tratamientos. ....	88

## RESUMEN

En el Ecuador, los recursos agrícolas representan una parte importante del potencial económico, de ahí que el uso de biofertilizantes representan una alternativa para la sustitución de fertilizantes químicos pues estos proporcionan mayor rentabilidad económica, aumentan la productividad de los cultivos, reducen los efectos de la fertilización química sobre el medio ambiente y la salud. Es por eso que en el presente trabajo se reporta la evaluación de consorcios con cianobacterias aisladas de suelos agrícolas para determinar su viabilidad y su potencial biofertilizante. Las cianobacterias se aislaron en medio sólido BG11o, de muestras tomadas de leguminosas completas con su raíz y rizósfera, cultivadas en la Parroquia Poaló ubicada al noroeste de la ciudad de Latacunga, Provincia de Cotopaxi. Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas fueron *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. y *Calothrix* sp. De la fase de escalamiento de los consorcios con estas cianobacterias se obtuvo un volumen final de 45 L, a partir del cual se cosechó la biomasa, producto de la sedimentación del cultivo, en un volumen de 1.125 L. Previa a la inoculación de los diferentes tratamientos se realizó un análisis físico-químico del suelo en donde se obtuvo que el porcentaje de materia orgánica era de 1.93%, nitrógeno 0.10%, fósforo 49.6 ppm, y azufre 13.08 ppm. Posteriormente se inocularon 12 bandejas con 2 kg de suelo cada una, procedente del mismo lugar de donde fueron aisladas las cianobacterias, cada una con cuatro tratamientos: testigo (400 mL de agua destilada), fertilizante químico (400 mL), consorcio de cianobacterias (250 mL de consorcio + 150 mL de agua destilada) y fertilizante químico + consorcio de cianobacterias (125 mL de consorcio + 75 mL de agua destilada). Los resultados de las evaluaciones de nutrientes de los diferentes tratamientos evidenciaron que la combinación de consorcio de cianobacterias y fertilizante químico brindó el contenido más alto de materia orgánica, N y S con 4.5%, 0.23% y 109.8 ppm respectivamente. El segundo contenido más alto de materia orgánica, N y S se reportó en el tratamiento con el consorcio de cianobacterias con 2.2 %, 0.11% y 90.2 ppm respectivamente.

Se establece un protocolo para la producción y mantenimiento de consorcios con cianobacterias fijadoras de nitrógeno, medio de cultivo y condiciones de escalado de los cultivos discontinuos. La conformación de consorcios cianobacterias- microalgas en biotecnología agrícola permite ampliar el espectro de microorganismos utilizados en biofertilización de suelos.

**Palabras clave:** Biofertilizante, cianobacterias, consorcios, suelos agrícolas.

## ABSTRACT

In Ecuador, agricultural resources are an important part of the economic potential, therefore the use of biofertilizers is an alternative for replacing chemical fertilizers as these provide greater economic returns, increase crop productivity, reduce the effects of chemical fertilization on the environment and health. In this way, this work reports the evaluation of cyanobacteria consortia isolated from agricultural soils to determine its feasibility and potential as a biofertilizer. Cyanobacteria were isolated on solid medium BG11o, from samples of whole legume with root and rhizosphere cultivated at northwest city of Latacunga, Cotopaxi Province. Nitrogen-fixing cyanobacteria isolated were *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. and *Calothrix* sp.. Escalation phase consortia with these cyanobacteria was performed where final volume was 45 L, from which biomass was harvested as a result of sedimentation of the culture, with a volume of 1.125 L. Prior to inoculation of the treatments, the physic-chemical analysis of the soil was performed where it was found that the percentage of organic matter was 1.93 %, nitrogeno.10 %, phosphorus 49.6 ppm, and sulfur 13.08 ppm. Subsequently 12 trays with 2kg of soil each one were inoculated with four different treatments: control (400mL of distilled water), chemical fertilizer (400mL), consortium of cyanobacteria (250mL consortium + 150 mL of distilled water) and chemical fertilizer + consortium of cyanobacteria (125mL consortium + 75 mL of distilled water). The results of the evaluations of nutrients from the different treatments showed that the combination of consortium of cyanobacteria and chemical fertilizer gave the highest content of organic matter, N and S with 4.5 %, 0.23% and 109.8 ppm respectively. The second highest content of organic matter, N and S are reported in the treatment with the consortium of cyanobacteria with 2.2 %, 0.11% and 90.2 ppm respectively. A protocol for the production and maintenance of nitrogen- fixing cyanobacteria consortia, culture medium and scaling conditions in batch culture was established. The formation of consortia microalgae- cyanobacteria in agricultural biotechnology broadens the range of microorganisms used in soil biofertilization.

**Keywords:** Biofertilizer, cyanobacteria, consortia, agricultural soils.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, los recursos agrícolas representan una parte importante del potencial económico. La producción agrícola va dirigida no sólo al consumo humano interno o la exportación, sino también al consumo animal. En 1986 se demostró que el 12% de los suelos de nuestro país (31.500 km<sup>2</sup>) estaban expuestos a erosión activa provocada por fuerzas múltiples incluyendo la actividad agropecuaria, monocultivo, alto uso de agroquímicos, labranza total y movimiento mecánico del suelo (Barrera & Oyarzun, 2000).

Según el III Censo Nacional Agropecuario en el 2000 el área de suelo sin uso agropecuario (bosques naturales y/o plantados, parques nacionales, reservas ecológicas, áreas protegidas, páramos, cuerpos de agua y centros urbanos), que alcanza el 52% de la superficie total del país, es considerada como erosionada y en proceso de erosión notable ( III Censo Nacional Agropecuario, 2000).

Los procesos más acelerados de erosión se encuentran en la Sierra, aunque también la desprotección de la cobertura vegetal de las cuencas hidrográficas de las vertientes pacífica y amazónica ha propiciado también severos procesos erosivos (Noni & Trujillo, 1986).

El uso indebido de la mecanización agrícola, y de los agroquímicos, ocasionan impactos negativos en el suelo de cultivo, donde el mayor problema es la erosión con el consiguiente desgaste físico, pérdida de la base nutrimental, húmica y de la actividad microbiana, en detrimento de la seguridad y soberanía agroalimentaria (Suquilanda, 2008).

Los fertilizantes, plaguicidas y desinfectantes químico-sintéticos han propiciado bajas sensibles de la productividad de la mayoría de los cultivos, severos desbalances en los agroecosistemas y contaminación ambiental, provocando impactos negativos en la salud de los agricultores y consumidores finales (Suquilanda, 2008). En el caso de los fertilizantes sintéticos se ha demostrado que presentan baja eficiencia ( $\leq 50\%$ ) para ser asimilados por los cultivos y además, el excedente no incorporado por las plantas trae un impacto ambiental adverso, tal como contaminación de mantos acuíferos con nitratos,

eutrofización, lluvia ácida y calentamiento global (Armenta, García, Camacho, Apodaca, & Montoya, 2010).

Actualmente existe una mayor conciencia social sobre la explotación racional de los recursos naturales, puesto que se ha demostrado la importancia de las relaciones entre los organismos. Sin duda, esto ha favorecido el desarrollo de tecnologías de producción menos contaminantes y ecológicamente más racionales, como el uso de los recursos microbiológicos del suelo en la agricultura (Aguirre, y otros, 2009).

Los biofertilizantes representan una importante alternativa para la sustitución de fertilizantes químicos ya que proporcionan mayor rentabilidad económica, aumenta la productividad de los cultivos, reduce los efectos de la fertilización química sobre el medio ambiente y la salud (Red BIOFAG, 2007).

La adopción y uso eficaz de biofertilizantes microbianos en agricultura, está llamada a ser una de las tecnologías clave, para asegurar la sustentabilidad y productividad de este sector tan importante para la economía y las sociedades de los países Iberoamericanos (Red BIOFAG, 2007).

Entre los beneficios del uso de microorganismos en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, descomponer residuos orgánicos, degradar plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, aportar nutrientes al suelo y producir compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Terry & Leyva, 2005).

Las cianobacterias pueden ser empleadas como biofertilizantes puesto que poseen células especializadas llamadas heterocistos que captan el nitrógeno atmosférico. En muchos países ya se han realizados estudios con estos microorganismos e incluso se está comenzando a producir a escala industrial, de ahí la importancia de evaluar el efecto biofertilizante de las cianobacterias en nuestro medio (Monteros & Iglesias, 2005).

Frente a los procesos acelerados de erosión en los suelos del Ecuador, el uso excesivo de los fertilizantes químicos y el impacto negativo que provocan en el medio ambiente y en la salud, la presente investigación estudió el aporte de materia orgánica y nitrógeno que las

cianobacterias pueden brindar a los mismos suelos agrícolas de donde han sido aisladas. Mediante la aplicación de biotecnología se produjo biomasa, de las cianobacterias aisladas de rizósferas y plantas leguminosas, que fue inoculada posteriormente al suelo de nuestro interés de estudio, tomando en consideración antecedentes de investigaciones que demostraron la efectividad de la inoculación de cianobacterias que fueron aisladas del mismo lugar (León & Rojas, 1996). Sin embargo, las cianobacterias son de carácter cosmopólita y pueden ser utilizadas y adaptarse fácilmente a otros suelos.

## **1.1 Objetivos de la investigación**

### **1.1.1 Objetivo General:**

Aislar y evaluar la viabilidad de cianobacterias de rizósfera de plantas leguminosas a nivel de laboratorio.

### **1.1.2 Objetivos Específicos:**

- Aislar e identificar cianobacterias de rizósfera de plantas leguminosas: *Phaseolus vulgaris* (fréjol), *Vicia faba* (haba), *Lupinus bogotensis* (chocho) y *Pisum sativum* (arveja).
- Evaluar la capacidad de crecimiento de las cianobacterias aisladas en condiciones de laboratorio.
- Seleccionar las cepas de cianobacterias, con mejor crecimiento, para ser utilizadas como consorcios en suelos agrícolas.
- Determinar el aporte de nutrientes del consorcio de cianobacterias en el suelo.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes

La necesidad de los agricultores de elevar al máximo la producción y de mejorar la calidad de su producto sumado al elevado costo de la fertilización química, hacen de la biofertilización una buena alternativa para las prácticas agrícolas, ya que la gran variedad de especies bacterianas que pueden utilizarse para la elaboración de inoculantes es tan abundante como los beneficios que se pueden obtener con su utilización (Cossoli, Iglesias, & Pérez, 2008).

La biofertilización a base de cianobacterias no es nueva ya que desde hace siglos los arrozales asiáticos han mantenido su productividad sin emplear fertilizantes gracias a la presencia de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Esta experiencia ha sido desarrollada en la India, China y Filipinas donde se cultivan cianobacterias en estanques, para ser vertidas en arrozales, para así aumentar su fertilidad y productividad (Garbisu, Blanco, Llama, & Sierra, 1999).

La biofertilización con cianobacterias ha contribuido en la restauración de la población de microorganismos que completan el ciclo biogeoquímico del carbono y del nitrógeno. La observación microscópica de biodermas inoculadas con *Nostoc muscorum*, reveló la presencia de una red intrincada de cianobacterias filamentosas y secreciones extracelulares de polímeros capaces de unir y mantener partículas minerales en la superficie del suelo (Sotelo, Iglesias, & Punos, 2008).

Se ha demostrado que la inoculación con *Aulosira fertilissima*, *Nostoc muscorum*, *Nostoc commune* y *Anabaena* sp. aumentó significativamente la captación de nitrógeno total en arroz (Gosh & Saha, 1997). Además, se han utilizado cianobacterias fijadoras de nitrógeno junto con el helecho acuático *Azolla* como biofertilizantes en el cultivo de arroz inundado (León & Rojas, 1996). El aumento de la actividad microbiana, como efecto de la co-inoculación de cianobacterias nostocales y *Bradyrhizobium japonicum*, también ha sido

descrita en suelo de un monocultivo de algodón por labranza convencional por más de 30 años que estaba evidentemente afectado (Sotelo, Iglesias , & Punos, 2008).

## **2.2 Microorganismos utilizados como biofertilizantes**

Los inoculantes son productos tecnológicos cuyo principio activo es un microorganismo vivo, que tiene la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente (Sanjuán, 2010).

Los microorganismos utilizados como inoculantes o biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: El primero incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánicos y mejorando la tolerancia al stress de la planta por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas. El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de microorganismos patógenos. Así mismo, algunos microorganismos pueden estar en los dos grupos, que además de promover el crecimiento de la planta, inhiban los efectos de microorganismos patógenos (Armenta, García, Camacho, Apodaca, & Montoya, 2010).

Los microorganismos que intervienen en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBNA), mediante la reducción enzimática de nitrógeno ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4$ ), se clasifican en dos grupos:

- a) Microorganismos que fijan nitrógeno en forma no simbiótica o de vida libre.
- b) Microorganismos que fijan el nitrógeno en forma simbiótica con plantas leguminosas y no leguminosas (*Azolla*, gramíneas y otras). En este sentido la mayor cantidad de nitrógeno atmosférico fijado, es llevado a cabo por bacterias asociadas a leguminosas y por actinobacterias del género *Frankia* que forman actinorrizas con varios géneros vegetales (Armenta, García, Camacho, Apodaca, & Montoya, 2010).

El suelo y el agua de la mayoría de los ecosistemas terrestres tienen la mayor diversidad de organismos, entre ellos las microalgas y cianobacterias, que representan aproximadamente el 27.4% del total de la biomasa microbiana. El papel ecológico y agronómico de las

cianobacterias en la fijación del nitrógeno en los ecosistemas áridos y semiáridos ha sido también ampliamente demostrado (Balasubramaniam, Mallavarupu, Kaduyala, Ravi, & Nambrantil, 2010).

## 2.3 Cianobacterias

Las cianobacterias son microorganismos procariotas conocidos como algas verde-azules o cianofitas (Lee, 1999). Son capaces de generar fotosíntesis oxigénica, sintetizar clorofila *a*, poseen al menos una ficobiliproteína, sintetizan glucógeno como producto de almacenamiento, presentan paredes celulares provistas de azúcares, aminas y aminoácidos (Carr & Whitton, 1982).

Estos microorganismos constituyen el grupo más grande y antiguo de los procariotas fotosintéticos oxigénicos, que se deduce de su amplia distribución con excepción de aquellos entornos con valores de pH bajos (Whitton & Potts, 2000)

Las cianobacterias tienen una buena adaptación ecológica y fisiológica al entorno en donde se desarrollan. Entre las ventajas ecológicas se distinguen las siguientes (Mann & Carr, 1992):

[1]. La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las cianobacterias es mayor que para la mayoría de algas eucariotas.

[2]. Muchas especies terrestres pueden tolerar altos niveles de radiación ultravioleta, mientras que el éxito de muchas especies planctónicas se debe a su capacidad para utilizar la luz eficazmente en condiciones de poca luz.

[3]. Son capaces de adaptarse a baja intensidad luminosa y a la cinética de absorción de nutrientes a baja temperatura ambiental.

[4]. Presentan tolerancia a la desecación y humedad. Característica que convierte a algunas cianobacterias en organismos más exitosos, incluso en ambientes de alta salinidad.

[5]. Algunas cianobacterias toleran el sulfuro libre a niveles mucho más altos que los tolerados por la mayoría de las algas.

[6]. Existen mecanismos que permiten a las cianobacterias fotosintéticas participar en la reducción de CO<sub>2</sub> de manera eficiente, incluso a niveles muy bajos de carbono inorgánico.

[7]. Ciertas cianobacterias presentan capacidad de fijar nitrógeno molecular, que proporciona ventaja competitiva en atmósferas de baja concentración de nitrógeno disuelto.

[8]. La capacidad de algunas especies de cianobacterias para formar vacuolas de gas y así aumentar la flotabilidad de los organismos, le proporciona la ventaja de permanecer en aguas con movimiento vertical.

Las cianobacterias muestran una considerable diversidad morfológica. Pueden ser unicelulares o filamentosas, y se pueden presentar solas o agrupadas en colonias (Whitton & Potts, 2000).

Cierta ramificación se produce cuando las células en un filamento tienen el potencial para dividirse en más de un plano. El mantenimiento de la estructura colonial en muchas de estas formas es ayudado por la presencia de exopolisacáridos, tales como mucílago y / o una vaina firme (Castenholz, 1992).

Las cianobacterias son a menudo los primeros microorganismos colonizadores de suelos áridos. Soportan la luz ultravioleta y muchas especies son capaces de vivir en el suelo y otros hábitats terrestres, donde participan en los procesos funcionales de los ecosistemas y en el ciclo de los elementos (Whitton & Potts, 2000).

Los hábitats importantes de las cianobacterias son los entornos límnicos y marinos. Estas prosperan en el agua salada, salobre o dulce, en aguas frías y calientes. Un número de especies de agua dulce también son capaces de soportar concentraciones relativamente altas de cloruro de sodio. Son habitantes de aguas termales, arroyos de montaña, nieve y hielo (Castenholz, 1992).

### **2.3.1 Características morfológicas**

Las células cianobacterianas varían en tamaño de 0,5  $\mu\text{m}$  hasta 50 a 100  $\mu\text{m}$ , siendo en tamaño promedio significativamente más grandes de la mayoría de las eubacterias y arqueas. En las formas unicelulares y coloniales las células son esféricas, bacilares o fusiformes, con considerable pleomorfismo en algunas cepas. Las células de los géneros

filamentosos son discoidales en forma de barril y los tricomas alcanzan longitudes en el orden de milímetros (García & Pichel, 2009)

Las células de la mayoría de las cianobacterias están rodeadas por una capa de exopolisacáridos más o menos definido. En algunos casos puede formar una cápsula o matriz. La envoltura celular es típica de Gram negativos, pero puede poseer una capa de peptidoglicano de espesor considerable (de hasta 200 nm) perforada por una variedad de poros de diferente tamaño, permitiendo el contacto de la membrana citoplasmática con el lipopolisacárido de la membrana externa (Herrero & Flores, 2008). La maquinaria fotosintética reside en membranas intracelulares llamadas tilacoides, que son extensiones de la membrana celular, y que pueden estar ordenados de forma paralela o radial a la misma. Los pigmentos accesorios, las ficobiliproteínas, se hallan en estructuras llamadas ficobilisomas unidas a la cara citoplasmática de los tilacoides (Herrero & Flores, 2008). Son comunes varios gránulos intracelulares de varios compuestos como glucógeno, polifosfatos y polihidroxicanoatos; además de gotas de lípidos, los cuales son comunes con otras bacterias. Se encuentra también la cianoficina que es un polímero de reserva de nitrógeno exclusivo de las cianobacterias. Los carboxisomas son inclusiones intracelulares unidas a la membrana que consisten en acumulaciones de la enzima RUBISCO. Mientras que, las vesículas de gas con estructuras cilíndricas de naturaleza proteica llenas de aire que se encuentran presentes en muchas especies planctónicas que les confieren flotabilidad a los organismos (Vincent, 2009).

### **2.3.2 Células especializadas en cianobacterias**

Los grupos portadores de heterocistos son claramente más que simples arreglos lineales de células, considerándose organismos realmente multicelulares, poseyendo todos los atributos requeridos para tal distinción: elementos estructurales supracelulares, respuesta comportamental a los estímulos medioambientales y distribución de las actividades a través de la diferenciación de varios tipos celulares (García & Pichel, 2009).

Los heterocistos son células más grandes que las vegetativas y que parecen estar vacías cuando son observadas bajo el microscopio; son células que se desarrollan en respuesta a la ausencia de una fuente de nitrógeno en el medio. Estas células son fotosintéticamente

inactivas, no fijan CO<sub>2</sub> y no producen oxígeno. Además, están rodeadas por una gruesa pared celular que limita el ingreso de gases atmosféricos, incluyendo el oxígeno (Castenholz, 1992). Debido a esto, el ambiente interno de los heterocistos es virtualmente anóxico, lo cual es ideal para la nitrogenasa, la cual es notoriamente sensible a oxígeno. Los acinetos son células que se forman bajo condiciones desfavorables (Whitton & Potts, 2000) y están restringidas a las especies con heterocistos (Nostocales y Stigonematales). Usualmente son mucho más grandes que las células vegetativas, con gruesas paredes celulares y alto contenido de reservas de nitrógeno en forma de gránulos de cianoficina. Debido a su resistencia a la desecación, bajas temperaturas (incluyendo proceso de congelación – descongelación) y a la digestión por animales, éstas células son consideradas estados de reposo de los ciclos de vida de las cianobacterias, pero se diferencian de las esporas típicas bacterianas en que no son resistentes al calor (Herrero & Flores, 2008). Se han reportado un amplio rango de factores fisicoquímicos que estimulan la diferenciación de los acinetos como deficiencia de fosfato, bajas temperaturas, limitación de carbono, y reducción de la disponibilidad de energía solar (Li & Watanabe, 1997).

### **2.3.3 Ecología y fisiología de las cianobacterias**

Las cianobacterias ocurren en un amplio rango de hábitats debido a características fisiológicas como tolerancia a altas temperaturas, altas irradiancias UV, desecación y sulfuro libre, y de su habilidad de utilizar bajas densidades de flujo de fotones y bajos niveles de carbono inorgánico, además de fijar nitrógeno molecular (Whitton & Potts, 2000). Sin embargo, en ambientes terrestres y de agua dulce, solo están ausentes por debajo de pH 4,0, donde cuya frecuencia y abundancia tiende a aumentar al aumentar el valor de pH. Son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, pero además en algunos casos pueden usar H<sub>2</sub>S para convertirlo en azufre elemental, a través de la fotosíntesis anóxica o anoxigénica (Whitton & Potts, 2000).

Las ficobiliproteínas, principales pigmentos antena de las cianobacterias, son solubles en agua y de naturaleza proteica, que contienen tetrapirroles de cadena abierta (ficobilina) como cromóforo. Las principales ficobiliproteínas corresponden a la aloficocianina (absorción máxima a 652 nm), ficocianina (absorción máxima a 615 nm) de color azul; y la ficoeritrina (absorción máxima a 562 nm) de color rojo (García & Pichel, 2009). Estas

absorben luz en un amplio rango de longitudes de onda del espectro visible y transfieren la energía de excitación por procesos, sin radiación a los centros de reacción en las membranas fotosintéticas para su conversión a energía química (Glazer, 1994). En algunas cepas, la composición de las ficobiliproteínas en los ficobilisomas puede ser regulada para optimizar la captura de fotones, de acuerdo al color de la luz disponible, un fenómeno conocido como adaptación cromática (Vincent, 2009).

Las cianobacterias son altamente tolerantes a la radiación UV, debido a varias estrategias para eliminar o mitigar sus efectos tóxicos. Algunas, evitan la exposición habitando en densas zonas de macrófitas o creciendo en el metalimnion. Otras especies poseen eficientes compuestos pantalla contra los rayos UV como la escitonemina y los aminoácidos similares a microsporinas. Algunas especies poseen tanta concentración de estos compuestos que son marrones o muy negras. Todas las cianobacterias producen carotenoides, como por ejemplo  $\beta$ -caroteno, mixoxantofila, equinenona, osciloxantina y cantaxantina; las cuales son potentes eliminadores de especies reactivas del oxígeno. Además, poseen varias defensas enzimáticas contra dichas especies reactivas de oxígeno como la superóxido dismutasa, y otros sistemas enzimáticos encargados de reconocer y reparar proteínas fotodañadas en el ADN y en los centros de reacción de la fotosíntesis. Esta combinación de mecanismos y alta tolerancia a la radiación UV, y quizás combinada con las múltiples “copias de seguridad” (seis o más cromosomas idénticos) del genoma cianobacteriano en cada célula, podrían contribuir a su enorme éxito ecológico en una gran variedad de hábitats (Vincent, 2009).

## **2.4 Aplicaciones de las Cianobacterias**

### **1.4.1 Producción de hidrógeno**

El hidrógeno como fuente de energía ha recibido mucha atención debido a las recientes crisis de combustible. Muchos organismos pueden producir hidrógeno usando una hidrogenasa reversible. Bajo condiciones apropiadas de cultivo, las cianobacterias fijadoras de  $N_2$  pueden producir  $H_2$  catalizado por la nitrogenasa. Por lo tanto, estos organismos constituyen sistemas biofotolíticos donde se genera  $H_2$  y  $O_2$  a partir de agua, pero en diferentes células vegetativas y heterocistos, respectivamente (Almon & Boger, 1988).

#### **2.4.2 Tratamiento de aguas residuales**

Como las microalgas, las cianobacterias pueden proveer de O<sub>2</sub> para la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) y además, incorporar nutrientes como nitrógeno, fósforo, toxinas orgánicas, metales pesados, y otros, en su biomasa (Borowitzka & Borowitzka, 1988). La utilización de estos microorganismos puede reducir los costos y recursos en la remoción de nutrientes y metales pesados en comparación con un tratamiento terciario convencional (De la Noüe, y otros, 1993). Contando además con la gran ventaja de que no genera contaminación adicional cuando se cosecha la biomasa y permite el reciclaje eficiente de los nutrientes (Gaubeca, 2003). Se han obtenido excelentes resultados de remoción de nutrientes y metales pesados utilizando cultivos de cianobacterias autóctonas como *Synechocystis* sp., *Oscillatoria* sp. y *Limnothrix* sp. (Jonte, 2003).

#### **2.4.3 Uso de Biomasa de Cianobacterias como complemento alimenticio Humano y Animal**

Desde los años cincuenta se han realizado importantes intentos de explotar fuentes de proteínas o suplementos alimentarios nuevos y alternativos, principalmente en anticipación al inminente aumento poblacional y a las insuficientes fuentes de alimento. En el pasado, los esfuerzos se habían concentrado en la producción de proteína unicelular (Lem & Glick, 1985). Actualmente, muchas cepas de microalgas y cianobacterias están siendo cultivadas a gran escala para la producción de pigmentos, suplementos vitamínicos y como alimentos sanos (Gantar & Svircev, 2008). Como cualquier otra planta, la composición química de las cianobacterias varía de cepa a cepa y de cultivo a cultivo, dependiendo de los parámetros ambientales como temperatura, iluminación, pH, medio de cultivo, etc. El alto contenido de proteínas de varias especies de microalgas y cianobacterias es una de las principales razones para su consideración una fuente alimentaria alterna.

Además son capaces de sintetizar todos los tipos de aminoácidos, proveyendo los esenciales a humanos y animales (Spolaore, Joannis- Cassan, Durán, & Isambert, 2006). Los carbohidratos se presentan principalmente en forma de azúcares y algunos otros

polisacáridos. Su digestibilidad en general siempre es alta, razón por la cual no existen problemas en utilizar a la célula completa como fuente de alimento (Becker, 2004).

#### **2.4.4 Producción de metabolitos con valor económico**

Una gran variedad de metabolitos como pigmentos, vitaminas y enzimas con una gran variedad de aplicaciones pueden ser obtenidos en una escala comercialmente viable a partir de cianobacterias. La clorofila a, es principalmente utilizada como antibacteriano y antiséptico, y es muy común en la formulación de caramelos, chicles, enjuagues bucales y demás productos de higiene bucal (Sekar & Chandramohan, 2008).

Mientras que, los carotenoides, que incluyen al  $\beta$ -caroteno y las xantofilas, poseen gran aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, principalmente como colorantes. Algunos géneros de cianobacterias producen gran cantidad de vitaminas como B y E (Borowitzka & Borowitzka, 1988).

Las ficobiliproteínas son usadas como colorantes proteicos naturales en la industria alimentaria y en la industria cosmética, como marcadores para inmunofluorescencia, en microscopía diagnóstica, citometría de flujo, histoquímica y en investigación biomédica, debido a su alta absorbancia y fluorescencia rojiza (Sekar & Chandramohan, 2008).

Además, las propiedades farmacológicas atribuidas a la ficocianina van desde antioxidante e anti inflamatoria, hasta actividad neuro y hepatoprotectora (Romay, Gonzalez, Ledon, Ramírez, & Rimbau, 2003).

También se ha detectado enzimas como  $\beta$ -lactamasas, proteasas, lipasas, fosfatasas, quiotinasas, celulasas, ureasas entre otras, a partir de cepas como *Nostoc*, *Anabaena* y *Phormidium* a bajo costo, debido a que la producción de biomasa de cianobacterias es relativamente más económica que la producción bacteriana (Sekar & Chandramohan, 2008).

Las cianobacterias son una de las fuentes más ricas de compuestos bioactivos, incluyendo toxinas con amplias aplicaciones farmacéuticas. Se ha reportado actividad pesticida, antiviral (herpes, HIV, entre otros), antibacteriana, antifúngica, anticoagulante, etc. de

compuestos específicos o de extractos provenientes de numerosas cianobacterias como *Nostoc*, *Scytonema*, *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Chroococcus*, *Phormidium*, *Rivularia*, entre otras (Mian, Heilmann, Bürgi, & Sticher, 2004).

#### **2.4.5 Cianobacterias como biofertilizantes**

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno pueden utilizar la luz solar como única fuente de energía para la fijación de carbono y nitrógeno y por lo tanto, tienen potencial como biofertilizantes (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Existe un actual interés en el rol de la fijación biológica de N<sub>2</sub> como fuente de nitrógeno fertilizante para reducir la dependencia de la agricultura en los combustibles orgánicos, lo cual a su vez reduciría las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Mishra & Kumar, 2007).

Los efectos benéficos de la inoculación con cianobacterias han sido reportados en cultivos como la cebada, avena, tomate, rábano, algodón, caña de azúcar, maíz, chiles y lechuga (Kaushik & Venkatamaran, 1979). Muchos autores atribuyen la fertilidad propia de los arrozales a la actividad de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Una gran variedad de cepas cianobacterianas colonizan estos ambientes, y su papel en el mantenimiento de la fertilidad ha sido bien documentado alrededor del mundo (Ventakataran, 1981).

A nivel mundial hay cerca de 100 millones de km<sup>2</sup> de campos de cultivo en los que aprovechan a las cianobacterias, de los cuales algunos son del sur de Europa y los Estados Unidos, cerca del 95% están en la India y el Oriente (Lee, 1999). En el sistema de agricultura sustentable de países como la India, los biofertilizantes son de bajos costos, no representan peligro alguno para el ecosistema en cuestión y son fuente renovable de nutrientes para la planta, en sustitución de los fertilizantes químicos (Kannaiyan, 2002).

Las cianobacterias terrestres juegan el papel de colonizadoras primarias en el establecimiento de microbiota en el suelo y en la acumulación de humus mediante cuatro rutas principales (Lee, 1999):

1. Mantienen la unión de las partículas de arena y suelo, evitando así, la erosión.

Las cianobacterias logran lo anterior con su envoltura gelatinosa y por su patrón de crecimiento, que produce una estrecha red que envuelve las partículas de suelo.

2. Ayudan a mantener la humedad del suelo.
3. Forman parte del reducido grupo de los microorganismos fijadores de nitrógeno (MFN) en el suelo.
4. Proveen a las plantas de sustancias promotoras del crecimiento o fitohormonas como las citoquinas.

## 2.5 Cianobacterias fijadoras de Nitrógeno

Las cianobacterias son los únicos organismos fijadores de nitrógeno capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, donde la enzima clave es la nitrogenasa (Stainer, Ingraham, Wheels, & Painter, 2005).

Las CFN han desarrollado tres mecanismos básicos para proteger a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno (Lee, 1999):

1. En un primer grupo se encuentran las cianobacterias filamentosas con heterocitos como *Nostoc* y *Anabaena*, y las filamentosas ramificadas también con heterocitos como *Fischerella* (Figura 1.) que tienen a la nitrogenasa confinada en los heterocitos, los cuales son células especializadas, distribuidas a lo largo o al final del filamento. Los heterocitos están rodeados de una pared glucolipídica gruesa que reduce la difusión del oxígeno hacia las células, cualquier oxígeno que se difunda hacia los heterocitos es reducido rápidamente por hidrógeno; así, la fijación de nitrógeno está espacialmente y metabólicamente separada del proceso fotosintético. Los heterocitos tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes, de tal manera que existe un continuo movimiento de los productos de la fijación de nitrógeno desde los heterocitos hacia las células vegetativas y de los productos fotosintéticos desde las células vegetativas hacia los heterocitos (UNAD, 2012).

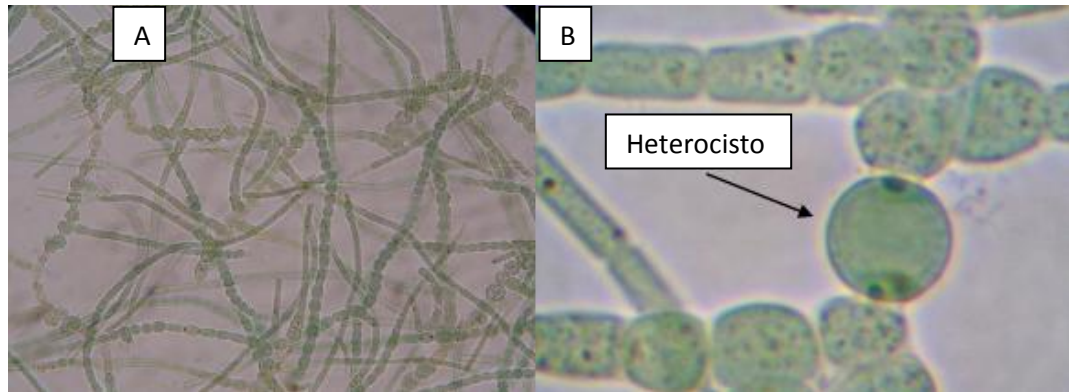


Figura 1. Cianobacterias filamentosas ramificadas con heterocistos. (A) Filamentos ramificados vistos a 40 X. (B) Heterocisto de un filamento ramificado visto a 100 X. Martínez, 2012.

2. En el segundo grupo se encuentran las cianobacterias unicelulares (como *Gloeocapsa*) que presentan la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno separados en tiempo, pues fijan nitrógeno atmosférico en la oscuridad cuando no hay producción de oxígeno por la fotosíntesis (Lee, 1999).
3. *Trichodesmium* es una cianobacteria filamentosas sin heterocistos que fija nitrógeno bajo condiciones aerobias únicamente con luz, lo que significa que mantienen la fijación de nitrógeno durante el período de luz, a expensas de una tasa respiratoria elevada para el consumo del oxígeno. *Trichodesmium* produce colonias que son la mayor fracción de microbiota planctónica de mares tropicales, y se estima que son responsables de fijar cuarta parte del total de nitrógeno en los océanos del mundo (Lee, 1999).

### 2.5.1 *Nostoc* y *Anabaena*

Como todas las especies con heterocistos y fijadoras de nitrógeno, las especies de estas cianobacterias pueden mantener la fertilidad del suelo en muchos sistemas terrestres (Whitton & Potts, 2000). Las especies de estos géneros se encuentran entre las cianobacterias más complejas, caracterizada por formas de crecimiento tanto multicelular como colonial y la aparición de células especializadas en la fijación de nitrógeno y en la dispersión. Estas adaptaciones, entre muchas otras, probablemente las convierte en uno de los grupos cianobacterianos con más éxito (Doods, Gudder, & Mollenhauer, 1995).

Además se caracterizan por su resistencia a la desecación y congelamiento, tolerancia UV, resistencia al pastoreo. (Doods, Gudder, & Mollenhauer, 1995). Dada la extrema diversidad de interacciones interespecíficas de estos géneros, su relación con actividades antropogénicas y su importancia en su gran variedad de hábitats, la gran cantidad de publicaciones sobre estudios de *Nostoc* y *Anabaena* no es sorprendente.

Las especies de *Nostoc* aisladas de diferentes ambientes han sido investigadas desde el punto de vista biotecnológico con el propósito de la producción de polisacáridos (De Philipps & Vincenzini, 1998). Los polisacáridos de *Nostoc* poseen una naturaleza ácida, debido a la presencia de ácidos urónicos, y están caracterizados por la presencia de grupos cargados como dominios peptídicos, aminoazúcares, etc. Estos polisacáridos poseen gran potencial en la industria alimentaria debido a que muestran una apreciable estabilidad de su viscosidad en un amplio rango de pH, temperatura y concentración de sales y podrían ser usados en emulsiones o como biofloculantes debido a la presencia de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (De Philipps & Vincenzini, 1998). Por su parte, *Anabaena* ha sido extensamente utilizada para estudios fisiológicos y genéticos, sobre todo relacionados con activación de genes frente a la deficiencia de nitrógeno y formación de heterocistes. Por otro lado, este género es de gran importancia en arrozales donde existe de forma aislada o formando simbiosis con el helecho *Azolla* (Prasanna & Nayak, 2007).

#### *Anabaena* sp.:

Género perteneciente al orden Nostocales y a la familia Nostocaceae (Komarék & Anagnostidis, 1999). Las células son cilíndricas, esféricas u ovaladas y se presentan en ambientes tanto terrestres como acuáticos (Ehling - Schulz & Bilger, 1997). Los heterocitos pueden ser intercalares o terminales (o ambos), esféricos, ovalados o cilíndricos, algunas veces alargados y usualmente más grandes que las células vegetativas (Komarék & Hauer, CyanoDBcz: a database of cyanobacterial genera, 2008).

Los tricomas (cadena de células sin una cubierta) sin mucílago, son normalmente móviles (usualmente menor de 1  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y no forman colonias. Los tricomas pueden ser rectos, curvos o en forma de espiral. Los acinetos (Figura 20) usualmente se forman en la fase tardía del crecimiento y su posición en los tricomas difiere según la especie (Ehling - Schulz & Bilger, 1997).

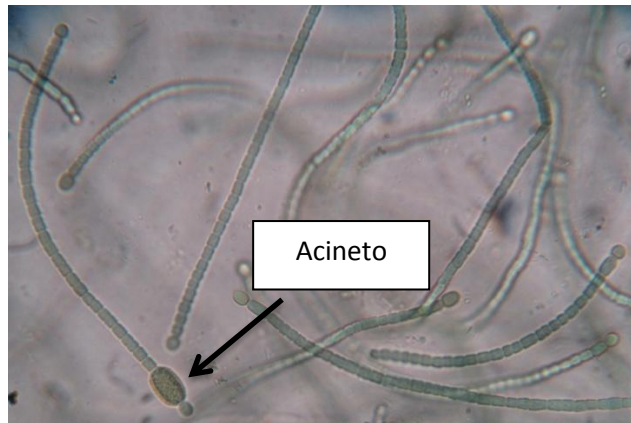


Figura 2. *Anabaena* sp. con acinetos (40X). Martínez, 2012.

Después de tres siembras por agotamiento, se aisló 3 cepas del género *Anabaena* sp. denominadas C2, C3 y C4.

*Nostoc* sp.:

El género *Nostoc* perteneciente al orden Nostocales y a la Familia Nostocaceae es una cianobacteria de hábitat bentónico (Komarék & Anagnostidis, 1999). Durante las observaciones microscópicas esta cepa se caracterizó por estar formado por filamentos curvos no ramificados, de células redondeadas con presencia de células especializadas como acinetos y heterocistos, todas ellas embebidas en una matriz mucilaginosa (Figura 3).

*Nostoc* es un género cosmopolita que se presenta en colonias en forma de emplastos, especialmente sobre rocas. Las cepas terrestres de la cianobacteria *Nostoc* florecen en habitats secos y fríos; los cuales están caracterizados por intensa radiación solar, diferencias extremas de temperatura y períodos regulares de desecación (Doods, Gudder, & Mollenhauer, 1995). En su hábitat natural, forma colonias macroscópicas con sus filamentos insertos dentro de un glicano gelatinoso (Ehling - Schulz & Bilger, 1997). También pueden presentarse como un componente menor de blooms cianobacterianos, pero raramente forma grandes y masivos agregados (Sinoven, Carmichael, & Namikoshi, 1990). Incluso, ciertas cepas terrestres son utilizadas en algunos países como suplemento alimenticio, como el caso de China y Japón (Gao & Ye, 2003).



Figura 3. Cepa de *Nostoc* sp. a 40X. Martíenz, 2012.

### 2.5.2 Ubicación Taxonómica de las Cianobacterias *Anabaena* y *Nostoc*

La Taxonomía se basa principalmente en las características morfológicas y en menor medida en las características ecofisiológicas, siguiendo para ello las pautas del Código Botánico de Nomenclatura. Esta clasificación ubica a las cianobacterias filamentosas *Anabaena* y *Nostoc* en el orden Nostocales (Komarék & Anagnostidis, 1999).

Sin embargo, la información genética adicional debe ser incorporada para dar un sistema de clasificación polifásico para Nostocales. Recientemente, muchos autores han utilizado este sistema para la caracterización y la evaluación taxonómica de diferentes taxones. En varios estudios el gen 16S rRNA se ha utilizado con éxito para la filogenia de cianobacterias incluyendo especies Nostocales. Aunque la molécula 16S rRNA contiene regiones variables, se conserva muy bien para el estudio de las especies de identidad o variación intraespecífica. También, las regiones no codificantes entre los genes 16S y 23S rRNA se han utilizado para discriminar entre diferentes especies de cianobacterias y para análisis filogenético también (Teneva, Stoyanov, Mladenov, & Dzhabazov, 2012).

Tabla 1. Taxonomía mediante la aproximación botánica del orden Nostocales (Komarék & Anagnostidis, 1999).

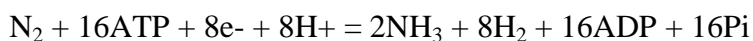
Orden	Familia	Algunos Géneros
<i>NOSTOCALES</i>	<i>Scytonemataceae</i>	<i>Scytonema</i> <i>Scytonemetopsis</i>
	<i>Microchaetaceae</i>	<i>Microchaete</i> <i>Petalonema</i> <i>Tolypothrix</i>

	<i>Rivulariaceae</i>	<i>Calothrix</i> <i>Cloetrichia</i> <i>Rivularia</i>
	<i>Nostocaceae</i>	<i>Cilindrospermum</i> <i>Anabaena</i> <i>Nodularia</i> <i>Nostoc</i>

El orden Nostocales (Tabla 1) incluye aquellas cianobacterias con organización en filamentos formados por células conectadas a través de la pared celular. Algunas, pueden presentar una vaina recubriendo los tricomas. Generalmente se reproducen por fragmentación del tricoma formando hormogonios y germinación de acinetos, su diferenciación principalmente es por la morfología de las colonias, los filamentos, así como por la diferenciación y posición de los heterocistos y acinetos. Dentro del orden se incluyen 32 géneros repartidos en 4 familias, en la familia Nostocaceae, se incluyen los géneros *Anabaena* y *Nostoc*.

## 2.6 Fijación de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso altamente consumidor de energía, que implica la reducción enzimática de nitrógeno (N<sub>2</sub>) a amonio (NH<sub>4</sub>). La poca capacidad de reacción de la molécula de nitrógeno se debe a que los dos átomos que la forman se encuentran enlazados por un triple enlace covalente que le da una gran estabilidad. Por esa causa ni las plantas ni los animales tienen posibilidad de utilizar la molécula de dinitrógeno en su metabolismo, aunque viven sumergidos en una atmósfera que contiene casi el 80 por ciento de N<sub>2</sub>. La reacción es llevada a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa con el consumo de 16 moléculas de ATP por N<sub>2</sub> reducido, según la ecuación (Armenta, García, Camacho, Apodaca, & Montoya, 2010):



Este sistema enzimático o complejo nitrogenasa, se compone de dos proteínas, la primera se llama nitrogenasa, complejo I o ferromolibdoproteína. Esta tiene cuatro subunidades, cada subunidad tiene dos centros Molibdeno-Hierro-Azufre (Mo-Fe-S) y un número variable de centros Hierro-Azufre (Fe-S) y es inactivada por el Oxígeno; a la segunda

proteína se le llama reductasa de la nitrogenasa, componente II o ferroproteína, es la más pequeña de los dos componentes y está formada por dos subunidades idénticas, tiene cuatro centros Fe-S que participan en las reacciones redox implicadas en la conversión de  $N_2$  a  $NH_3$ , esta proteína es muy sensible al oxígeno y se inactiva de manera irreversible en su presencia (Stainer & Cohen- Bazire, 1977) .

El mecanismo de acción del complejo es el siguiente: los electrones se transfieren a través de un reductor de bajo potencial (ferredoxina o flavodoxina) hasta la reductasa de la nitrogenasa; luego, paralelamente a la hidrólisis masiva de moléculas de ATP (16 moléculas de ATP por cada molécula de  $N_2$  reducida), los electrones se transfieren a la nitrogenasa, donde ocurre la reducción de  $N_2$  e H a  $NH_3$  e  $H_2$ . La pérdida de  $H_2$  aumenta el costo energético de la fijación de nitrógeno. Sin embargo, *Anabaena* tiene una enzima hidrogenasa, capaz de ganar energía oxidando el  $H_2$ . El sitio activo en el cual ocurre la reducción contiene un cofactor especial con molibdeno. Este sistema complejo de nitrogenasa esta codificado por 15 genes dispuestos en siete operones contiguos (Stainer & Cohen- Bazire, 1977).

Los requerimientos básicos para la FBNson la enzima nitrogenasa, agentes reductores, ATP y una baja tensión de oxígeno (Thayumanayan & Paryathy, 2002).

1. Enzima nitrogenasa: La reducción de  $N_2$  a  $NH_4^+$  es catalizado por el complejo nitrogenasa, el cual es muy similar en función y composición en todos los procariontes. Los dos componentes clave de este complejo son la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa (Thayumanayan & Paryathy, 2002)
2. Agentes reductores (donadores de electrones). La fijación de nitrógeno es un proceso reductivo y las fuentes inmediatas de electrones son (Thayumanayan & Paryathy, 2002):
  - a) Ferredoxina reducida
  - b) Flavodoxina reducida
  - c) Piruvato

3. ATP (Adenosín - trifosfato). Un mínimo de 2 moléculas de ATP son hidrolizadas por cada electrón transferido de la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa (Thayumanayan & Paryathy, 2002).

El ATP requerido para la fijación de nitrógeno es abastecido por alguna de las siguientes rutas:

- a) Por oxidación del sustrato en la respiración
  - b) Por conversión de piruvato a acetato
  - c) A través de fotofosforilación
- 
4. Baja tensión de oxígeno. La nitrogenasa es muy sensible ante el O<sub>2</sub>, pues éste reprime la síntesis de las proteínas de la nitrogenasa. La dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa se inactivan en contacto con el aire, la vida media es de únicamente 30 s a 2 min para la primera y de 4.5 a 10 min para la segunda. El cofactor Mo-Fe es más sensible al oxígeno que la dinitrogenasa reductasa (Thayumanayan & Paryathy, 2002).

# **CAPÍTULO III**

## **MARCO METODOLÓGICO**

### **3.1. Materiales**

#### **3.1.1. Materiales para muestreo de suelos**

- Azadón
- Pala de desfonde

Etiquetas

- Fundas de plástico con cierre ziploc

#### **3.1.2. Materiales para laboratorio**

- Tamices de suelo
- Tijeras
- Probetas cilíndricas 100 mL
- Probetas cilíndricas 1000 mL
- Matraz Erlenmeyer 100 mL
- Mateaz Erlenmeyer 500 mL
- Matraz Erlenmeyer 1000mL
- Vaso de precipitación 500m L
- Mortero
- Embudo
- Cajas Petri
- Placas cubreobjetos
- Placas portaobjetos
- Pipetas pasteur 3mL
- Pipetas automáticas 20 – 100 µl
- Pipetas automáticas 1000 µl
- Tubos de ensayo 10 mL
- Frascos de vidrio autoclavables

- Mangueras plásticas
- Varillas de vidrio
- Motores de pecera de doble entrada
- Algodón
- Gasa
- Parafilm
- Cinta adhesiva
- Lámparas fluorescentes con tubos de 40 W
- Asa microbiológica
- Tuberías
- Cubetas plásticas
- Temporizador
- Tirillas para medir pH

### **3.1.3. Equipos de laboratorio**

- Autoclave
- Refrigerador
- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Balanza automática
- Microscopio óptico
- Salinómetro
- Luxímetro

### **3.1.4. Medios de cultivo y reactivos**

- Medio de cultivo BG110
- Medio de cultivo Nitrofoska foliar
- Medio extracto de suelo
- Agar Agar
- Metanol
- Glicerol

### **3.2 Ámbito de estudio**

Recolección de muestras: terreno experimental del Colegio Nacional Poaló (2.918 m.s.n.m., una longitud de 758.975°, 00 y una latitud de 9°02.711°, 00), ubicada al Noroeste de la ciudad de Latacunga, Provincia de Cotopaxi.

Estudio y procedimientos de laboratorio: Laboratorio de docencia de Microbiología Agrícola de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y el laboratorio de fisiología de la Unidad de Biología del Centro de Ciencias de la Universidad Central del Ecuador.

### **3.3 Muestreo de suelos y raíces**

Se recolectaron varias plantas leguminosas completas (*Phaseolus vulgaris* (fréjol), *Vicia faba* (haba), *Lupinus bogotensis* (chocho) y *Pisum sativum* (arveja)) con su raíz y rizósfera, cultivadas en suelos areno arcillosos, en la Parroquia Poaló. Posteriormente estas plantas fueron trasladadas al laboratorio para ser procesadas.

### **3.4 Preparación de medios de cultivo**

Para el crecimiento y recuperación de cianobacterias de la rizósfera de leguminosas se utilizaron dos medios de cultivo: Nitrofoska foliar y BG-11°, cuya formulación se presenta en la Tabla 2.

#### **3.4.1 Medio de cultivo Nitrofoska**

Para preparar un litro de medio de cultivo Nitrofoska foliar se diluye 3 mL de Nitrofoska foliar en 997 mL de agua destilada estéril.

Tabla 2. Composición de Nitrofoska foliar

Macroelementos		Microelementos		Para 1 mL/L	
Nitrógeno (N)	10,0%	Fe	70 ppm	DQO*	11,74 mg/L
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	4,00%	B	11 ppm	P-PO <sub>4</sub> *	10,35 mg/L
Potasio (K <sub>2</sub> O)	7,00%	Cu	12 ppm	N-total *	20,72 mg/L
Magnesio (MgO)	0,2%	Mn	8 ppm	N-NH <sub>4</sub> *	10,64 mg/L
Azufre (S)	0,8%	Zn	2 ppm	N-orgánico*	10,08 mg/L
		Co	12 ppm		
		Mo	1 ppm		

Datos aportados por el fabricante. \*Datos obtenidos en el laboratorio LUZVE (Díaz, 2011)

### 3.4.2 Medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>

Este medio no contiene fuente de nitrógeno como el medio BG-11, con la finalidad de promover la fijación del N<sub>2</sub> por el consorcio (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stainer, 1979). La fuente de sodio (Na) es cloruro de sodio (NaCl). El pH del medio BG-110 es de 7.7 ± 0.9. Para la preparación de un litro del medio BG--11<sub>0</sub> se añade 10 mL de la solución stock I, 10 mL de la solución stock II, 10 mL de la solución stock III y 1mL de la solución stock IV. Posteriormente se procede a autoclavar el medio de cultivo por 15 minutos a 15 libras de presión.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>.

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

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

### 3.5 Obtención de cianobacterias

Con la ayuda de unas tijeras, en condiciones de esterilidad junto al mechero, se procedió a cortar las raíces de las plantas y colocarlas en dos cajas de Petri estériles. En una caja de Petri se añadió 5 mL de medio de cultivo Nitrofoska foliar, y a otra caja de Petri se añadió 5 mL del medio BG11, con un replica de cada caja.

Además se tomó 5 g del suelo de la rizósfera de las plantas leguminosas y se colocó en dos cajas de Petri estériles, a la una caja se le añadió 5 mL de medio de cultivo Nitrofoska foliar, y a la otra caja de Petri se añadió 5 mL del medio BG11.

Luego las cajas de Petri se incubaron en condiciones de luminosidad bajo una lámpara fluorescente lateral marca Philips Daylight de 40 W.

Después de transcurrido un mes aproximadamente, aparecieron las primeras poblaciones de microalgas y cianobacterias, las mismas que tras ser observadas e identificadas con un microscopio óptico fueron aisladas en medio sólido BG-11<sub>0</sub>, por agotamiento con un asa microbiológica estéril junto al mechero.



Figura 4. Poblaciones de microalgas y cianobacterias asociadas a las muestras de de raíces y rizósfera de leguminosas con medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>. Martínez, 2012.

### 3.6 Aislamiento de cianobacterias

Luego de dos semanas de incubación en condiciones de luminosidad con un fotoperíodo 12:12, y a una temperatura de 20 °C ±2 se observó nuevamente al microscopio las poblaciones de microalgas y cianobacterias para identificar y purificar las cianobacterias con una resiembra por agotamiento en medio sólido BG-11<sub>0</sub> con Bicarbonato de Sodio (Morales Avendaño, 2011).

A partir de estas observaciones y con ayuda de material bibliográfico se realizó la descripción de las características morfológicas de las cianobacterias (Streble, Krauter, & Rieradevall Sant, 1987).



Figura 5. Cepa de *Nostoc* spp. aislada en medio sólido BG-11<sub>0</sub>. Martínez, 2012.

#### 3.6.1 Producción de biomasa de las cianobacterias

Las cepas seleccionadas de cianobacterias se escalaron con medio BG-11<sub>0</sub> líquido en tubos de ensayo de 10mL. Posteriormente se inició el sistema de cultivo discontinuo en matraces Erlenmeyer de aproximadamente 500 mL de capacidad, con un inóculo de 100 mL de cultivo con cada una de las 6 diferentes cepas de cianobacterias que fueron aisladas. Cada frasco de cultivo estaba conectado a un sistema de aireación de 5mLs<sup>-1</sup>, conformado por tubos de aireación de vidrio de 12 cm de largo unidos a mangueras de plástico, alimentados por motores para acuarios de 2 salidas. El flujo de aire generado por motores de pecera de doble entrada provocó un movimiento conectivo del medio, paralelo a la dirección de la luz reduciendo con esto el autosombreado, el incremento del tiempo de permanencia de las

células en zonas iluminadas y la frecuencia de iluminación de las mismas (Lee & Palsson, 1994).

La iluminación fue lateral con lámparas fluorescentes con tubos de 40 W y la intensidad luminosa fue medida con un fotómetro marca Fisher Scientific que permitió colocar los ensayos expuestos a 8 Klux (unidad del SI para medir la luz). Para la conversión de LUX a  $\mu\text{mol q m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se utilizó el factor propuesto por Ginzburg (1987), es decir,  $1 \mu\text{mol q m}^{-2}\text{s}^{-1} = 51,2 \text{ lux}$ . El fotoperíodo fue de 12:12 regulado con un temporizador modelo 4001-00 Td-1724-00. Además, en todos los cultivos el pH se mantuvo aproximadamente en 8 utilizando tirillas para medir el pH marca Macherey- Nagel.



Figura 6. Sistema de cultivo discontinuo de las cianobacterias aisladas. Martínez, 2012.

Posteriormente se continuó con el proceso de escalamiento de 500 mL a 4 litros de cultivo, igualmente mediante un sistema de cultivo discontinuo alimentados semanalmente con 1L de medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>, con una aireación de  $5\text{mLs}^{-1}$ , a una temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , una intensidad luminosa de  $156\mu\text{mol q m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y a un pH de 8. Para el escalamiento de los cultivos de los consorcios de cianobacterias se evaluó que el cultivo se mantenía estable con la misma tasa de crecimiento celular cuando el incremento del medio de cultivo era de 1L por semana.



Figura 7. Producción de biomasa de cianobacterias. Martínez, 2012.

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



Figura 8. Escalamiento de cultivo de cianobacterias a 6L. Martínez 2012

Finalmente se procedió a realizar un pool con las 6 cepas de cianobacterias, tomando 1 L de cada cepa y 2 L de medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>, y se continuó manteniendo el sistema de cultivo del consorcio bajo los mismos parámetros de luminosidad, aireación y pH que mantenían los sistemas de cultivo de las cepas por separado hasta su inoculación en los suelos, hasta alcanzar un volumen de 45 L al cabo de 3 meses. En el consorcio de cianobacterias estuvo presente *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. en una proporción de 70 y 30% respectivamente.



Figura 9. Sistema de cultivo del consorcio de cianobacterias. Martínez 2012.

### 3.7 Monitoreo de la producción de los consorcios de cianobacterias

Para monitorear la producción de los consorcios de cianobacterias, se analizó varios parámetros y condiciones del sistema de cultivo, como se detalla a continuación:

#### 3.7.1 Determinación de turbidez de los consorcios

Se evaluó la turbidez de los consorcios por densidad óptica a 750 nm ( $DO_{750}$ ). Las lecturas se realizaron por triplicado. Para lo cual se tomó 5 mL del cultivo en un tubo de ensayo y se realizó la lectura en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D Milton Roy. (Morales Avendaño, 2011)

#### 3.7.2 Cuantificación de pigmentos liposolubles

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

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

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

$$\text{Clorofila } a (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = \left( \frac{DO_{665} \times 13.14}{\text{vol. de la muestra}} \right) \times \text{vol. del extracto}$$

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

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

### 3.7.3 Cuantificación de compuestos hidrosolubles

Se tomó 5 mL de cultivo en un tubo de ensayo, con tres réplicas por cada consorcio y se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos, utilizando una centrifuga DYNAC. Se descartó el sobrenadante y se añadió 4 gotas de glicerol. Luego se colocó la muestra bajo congelación durante 24 horas, una vez retirada la muestra del congelador se añadió 2mL de agua destilada y se agitó vigorosamente con la ayuda de un vortex. Posteriormente se sometió a las muestras, en los tubos de ensayo, a un proceso de congelación y descongelación durante tres ocasiones. Después se centrifugó la muestra a 10000 rpm por 15 minutos y se colectó el sobrenadante para seguidamente medirlo en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D Milton Roy a 562, 615 y 652 nm.

La concentración de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina se determinó de acuerdo a las fórmulas propuestas por Bennett y Bogorad (Bennet & Bogorad, 1973):

$$\text{Ficocianina (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} = \left[ \frac{(DO_{652} \times 0.474)/5.34}{\text{vol.de la muestra}} \right] \times \text{vol. del extracto}$$

$$\text{Aloficocianina (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} = \left[ \frac{(DO_{652} \times 0.208)/5.09}{\text{vol.de la muestra}} \right] \times \text{vol. del extracto}$$

$$\text{Ficoeritrina (mg} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} = \left[ \frac{(DO_{562} - FC \times 2.41 - (AFC \times 0.849))/5.34}{\text{vol.de la muestra}} \right] \times \text{vol. del extracto}$$

### 3.7.4 Irradiación

Existen diferentes condiciones para la producción de biomasa de las cianobacterias, entre ellas es de notable importancia la irradiación. Diferentes estudios con distintos fines reportan irradiaciones muy variables para cianobacterias, irradiaciones que van de 1.071 Klux (Schagerl & Müller, 2006) hasta 23 Klux (Guerrero , Moreno, Vargas , Olivares, & Rivas, 1998) e incluso emplean la luz solar que alcanza los 100 Klux en un día soleado (Masojidek, Koblizek, & Torzillo, 2004).

La irradiación para los consorcios de cianobacterias en estudio fue de 8Klux con un fotoperíodo de 12:12, fue monitoreada continuamente con un fotómetro (Figura 23). La

concentración final de los consorcios A, B y C permitía que la luz que atravesaba el fotobiorreactor fuera de 0.24, 0.27 y 0.23 Klux respectivamente.

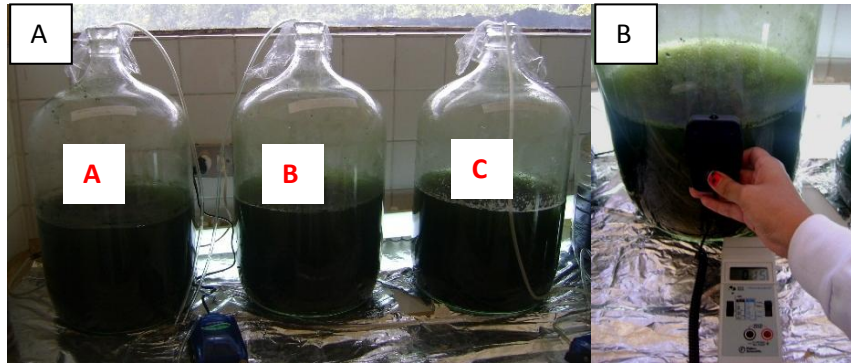


Figura 10. A. Consorcios de cianobacterias en estudio A, B y C. B. Monitoreo de irradiación de los consorcios. Martínez, 2012.

### 3.7.5 Salinidad

La salinidad es otro factor que puede afectar el crecimiento de los microorganismos, en función principalmente de su actividad osmótica. Las cianobacterias difieren ampliamente en su relación con la salinidad y muchas de ellas están adaptadas a ambientes marinos (Oren, 2000). La tolerancia a la salinidad varía según la especie por lo tanto es de suma importancia la caracterización fisiocológica de cepas autóctonas. La salinidad de los consorcios de cianobacterias fue monitoreada constantemente por un salinómetro, y obteniendo como resultado que la salinidad se mantuvo en 0% durante toda la fase de producción de biomasa (Figura 24).



Figura 11. Evaluación de la salinidad de los consorcios de cianobacterias

### **3.7.6 pH**

En general el crecimiento de cianobacterias tiene un mejor desarrollo en las aguas neutras y alcalinas entre los pH de 7.5 y 10, debido a que están adaptadas a utilizar el bicarbonato disuelto en el agua como forma de asimilación de carbono inorgánico para el proceso fotosintético (Domingo & Romero, 2011).

Los resultados obtenidos en el sistema de cultivo de los consorcios de cianobacterias indicaron que son capaces de mantener un crecimiento sostenible entre un pH de 7,80 y 8,00.

### **3.7.7 Temperatura**

Diferentes estudios científicos han demostrado que las cianobacterias crecen mejor a temperaturas comprendidas entre los 15°C y los 30°C, sin embargo, se ha reportado que las mayores tasas de crecimiento y reproducción se alcanzan a los 25°C que es considerada la temperatura óptima de crecimiento (Domingo & Romero, 2011).

La temperatura promedio a la que se mantuvieron expuestos los consorcios de cianobacterias fue de 16°C.

### **3.7.8 Muestreo de suelo para análisis químico.**

Para el análisis químico del suelo se delimitó el área del terreno, se recolectó las submuestras para lo cual se hizo un recorrido de recolección en forma de zig- zag hasta obtener 2 Kg de suelo. Se identificó la muestra con todos los datos necesarios (provincia, cantón, parroquia, altura, altitud, longitud, manejo agronómico, edad del cultivo, etc.) Posteriormente las muestras se enviaron al laboratorio de suelos en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD, entidad adscrita al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, para determinación de nutrientes (Bo, Na, S, K, Mn, N, P, Mg, Zn, Fe, Ca, Cu), materia orgánica, capacidad de intercambio de cationes, pH.

### 3.7.9 Preparación del sustrato

Como sustrato se empleó 2 kg de tierra negra que fue recolectada de la misma zona de donde fueron aisladas las cianobacterias. Se retiró del suelo las impurezas como piedras o ramas. Posteriormente fue tamizada en mallas # 12 y se la dejó secar con luz solar en bandejas plásticas.



Figura 4. Tamizado del suelo. Martínez, 2012.

### 3.7.10 Preparación de los tratamientos

Los tratamientos que se consideraron para el presente estudio fueron los siguientes: testigo; inoculado; fertilizado químico; fertilizado químico + inoculado.

Tabla 4. Tratamientos aplicados a suelo agrícola. PUCE, 2012.

Tratamiento	Descripción	Cantidad
TE	Testigo (Agua destilada)	400mL
TCC	Consortio de cianobacterias	400mL
TFQ	Fertilizante químico	400mL
TCF	Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	400mL

### 3.7.11 Preparación del inóculo del consorcio de cianobacterias

Se procedió a cosechar el consorcio, mediante sedimentación natural de la biomasa, luego de apagar el sistema de aireación del cultivo. Posteriormente, se decantó el sobrenadante líquido por varias ocasiones hasta obtener únicamente la biomasa que corresponde a un volumen de 1.125 L.



Figura 5. Mezcla de los concentrados de los consorcios con gran cantidad de sobrenadante. Martínez, 2012.

Luego se distribuyó en tres botellas de vidrio 250 mL del consorcio y se aforó a 400mL con agua destilada, que corresponde al volumen que necesitan 2 kg de suelo para quedar completamente humedecidos.

### 3.7.12 Preparación del fertilizante químico

El fertilizante químico que se utilizó para el ensayo fue el 10-20-10 de la casa comercial NutriMicros Producción, cuyos números indican el porcentaje de nitrógeno, fósforo y potasio respectivamente en 100 libras del fertilizante (Masabni & Lillard, 2011). Para su preparación se pesó 4,0 g del fertilizante químico y se colocó en botellas de vidrio con 400 mL de agua destilada, lo cual corresponde a una concentración del fertilizantes del 1% (p/v).

### 3.7.13 Preparación del consorcio de cianobacterias + el fertilizante químico

Para la preparación del inóculo para el tratamiento del consorcio de cianobacterias junto con el fertilizante químico se utilizó la mitad de las cantidades utilizadas en los anteriores inóculos.

En tres botellas de vidrio se colocó 125 mL del consorcio de cianobacterias y 2,0 g de fertilizante químico, en cada una y posteriormente se ajustó el volumen final a 400 mL con agua destilada, equivalente a una concentración del fertilizante de 0,5% (p/v).

### 3.8 Aplicación de tratamientos en el suelo

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

Tabla 5. Distribución aleatoria de los tratamientos de estudio.

<b>Bandeja 1</b>	Tratamiento Fertilizante Químico #2	<b>Bandeja 7</b>	Tratamiento Fertilizante Químico #3
<b>Bandeja 2</b>	Tratamiento con Consorcio de Cianobacterias #2	<b>Bandeja 8</b>	Tratamiento con Consorcio de Cianobacterias #3
<b>Bandeja 3</b>	Tratamiento con Consorcio de Cianobacterias + Fertilizante Químico #1	<b>Bandeja 9</b>	Tratamiento con Testigo #1
<b>Bandeja 4</b>	Tratamiento con Testigo #2	<b>Bandeja 10</b>	Tratamiento Fertilizante Químico #1
<b>Bandeja 5</b>	Tratamiento con Consorcio de Cianobacterias + Fertilizante Químico #2	<b>Bandeja 11</b>	Tratamiento con Testigo #3
<b>Bandeja 6</b>	Tratamiento con Consorcio de Cianobacterias + Fertilizante Químico #3	<b>Bandeja 12</b>	Tratamiento con Consorcio de Cianobacterias #1

La inoculación se realizó a nivel de laboratorio en bandejas plásticas de aproximadamente 30 cm x 30 cm x 20 cm. con 2,0 kg de suelo e inoculadas con los tratamientos TE, TCC, TFQ, TCF. Para el testigo se aplicó únicamente 400 mL de agua destilada.



Figura 6. Tratamientos de estudio. Martínez, 2012.

Los consorcios de cianobacterias fueron inoculados cuando obtuvieron una absorbancia de 1.36 a 750nm.

Se inoculó 4,0 g del fertilizante químico disuelto en 400 ml de agua destilada por cada bandeja del tratamiento (Morales Avendaño E. , 2013) .

Para el tratamiento del consorcio de cianobacterias + fertilizante químico se inoculó 2,0 g del químico con 150mL del consorcio de cianobacterias, aforados a 400 mL con agua destilada.



Figura 7. Inoculación del tratamiento con el consorcio de cianobacterias + fertilizante químico.

Durante el ensayo, cada uno de los tratamientos fue regado diariamente con 400 mL de agua corriente.

### 3.9 Evaluación de la viabilidad de los consorcios de cianobacterias

Posterior a la inoculación del suelo se monitoreó las poblaciones de cianobacterias presentes cada semana durante cinco semanas. Para la observación y recuentos al microscopio, con la ayuda de una espátula y una malla cuadrículada se tomó manualmente muestras compuestas de la superficie del suelo de aproximadamente 0,5 g de cinco diferentes puntos de cada tratamiento. Los cinco puntos de muestreo fueron alternados en cada toma de muestra como lo muestra la figura 15.

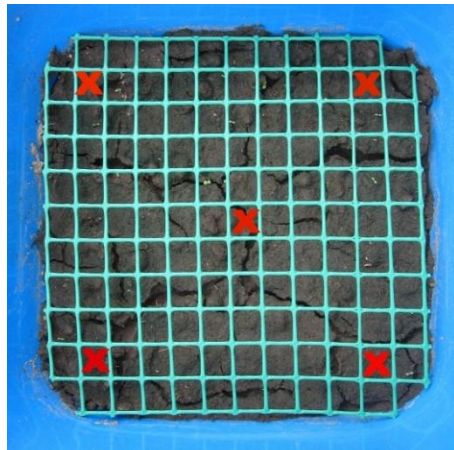


Figura 8. Muestreo de la primera semana. Martínez, 2012.

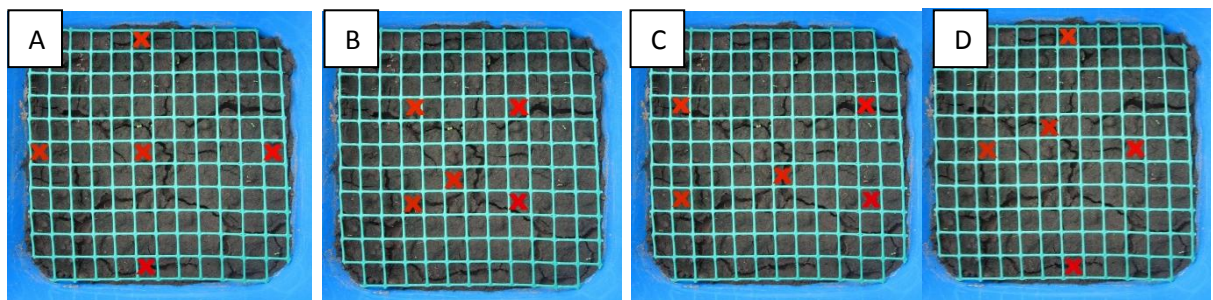


Figura 9. A. Muestreo de la segunda semana. B. Muestreo de la tercera semana. C. Muestreo de la cuarta semana. D. Muestreo de la quinta semana. Martínez, 2012.

Las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo con 3,0 mL de agua destilada, para posteriormente ser observadas al microscopio e identificar las microalgas y cianobacterias presentes.

Al finalizar el ensayo se realizó un nuevo análisis químico del suelo para determinar la influencia de las poblaciones microbianas.

### **3.10 Análisis de datos**

#### **3.10.1 Viabilidad de las cianobacterias**

La evaluación de la viabilidad de las cianobacterias en el sustrato consistió en la observación microscópica de la presencia o la ausencia de crecimiento de cianobacterias sobre el suelo, que previamente fue inoculado con los diferentes tratamientos.

En los tratamientos que evidenciaron una presencia de cianobacterias se identificaron los géneros de las cianobacterias y se procedió a cuantificarlos atribuyéndoles valores numéricos como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Valores asignados al número de cruces para la observación de cianobacterias y microalgas (Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo, & Arévalo, 2013).

<b>Valores numéricos</b>	<b>Valor</b>
3	Abundantes
2	Moderados
1	Escasos

#### **3.10.2 Análisis químico del suelo**

Para la fase experimental a nivel de laboratorio se empleó un diseño completamente al azar (DCA) en el cual se investigó la influencia de los diferentes tratamientos inoculados en el suelo, a través de análisis químicos (Bo, Na, S, Mn, N amoniacal, P, Mg, Zn, Ca, Cu,

materia orgánica, capacidad de intercambio de cationes, pH). Se realizó tres repeticiones de cada tratamiento con el diseño planteado.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se analizaron mediante el empleo del software estadístico SPSS 2.0 y las pruebas de significancia de Tukey.

### **3.10.3 Análisis de plántulas en el suelo**

Al día 28 se evidenció la aparición de pequeñas plántulas que crecieron en los suelos. A partir del cual se procedió a contar el número de plantas que había en cada uno de los tratamientos y a identificarlas a nivel de familias, género y especie con la ayuda de material bibliográfico del Herbario Nacional. Este análisis se realizó con el objetivo de evaluar si existe una relación entre el número de plantas con la presencia de cianobacterias en los tratamientos (Ansín, Deregibus, & Lanfranco, 2012).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Registro de microalgas y cianobacterias de suelos cultivados con plantas leguminosas (Latacunga- Cotopaxi – Ecuador).

El florecimiento de microalgas y cianobacterias tanto en muestras de rizósfera como en raíces de leguminosas se evidenció al tercer mes de haberse iniciado la inoculación con medios de cultivo Nitrofoska foliar y BG11.

Se identificaron 7 taxas de microalgas y 7 de cianobacterias en las muestras de los suelos y de rizósferas de las leguminosas evaluadas como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Registro de taxas de microalgas y cianobacterias asociadas en rizósfera de leguminosas.

<b>Microalgas</b>	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	<i>Chlorella</i> sp.
	<i>Scenedesmus</i> sp.
	<i>Chlorococcum</i> sp.
	<i>Desmodesmus</i> sp.
	<i>Navícula</i> sp.
	<i>Pediastrum</i> sp.
<b>Cianobacterias</b>	<i>Nostoc</i> sp.
	<i>Calothrix</i> sp.
	<i>Anabaena</i> sp.
	<i>Phormidium</i> sp.
	<i>Pseudanabaena</i> sp.
	<i>Lyngbya</i> sp.
	<i>Leptolyngbya</i> sp.

La variedad de especies tanto de microalgas como cianobacterias, además de su viabilidad al parecer también estuvo relacionada al tipo de planta a partir de la cual se tomó las muestras de rizósfera y raíces.

Tabla 8. Microalgas y cianobacterias asociadas tanto en la rizósfera como raíces de leguminosas de acuerdo al tipo de planta.

MUESTRA	PLANTA	MEDIO DE CULTIVO	MICROALGAS/CIANOBACTERIAS
A1 Raíz	Chocho	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Navícula</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Desmodesmus</i> sp.
A1 Raíz	Chocho	Nitrofoska	<i>Anabaena</i> sp.
A1 Raíz	Chocho	BG11	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A1 Raíz	Chocho	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A1 Suelo	Chocho	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A1 Suelo	Chocho	BG11	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A2 Raíz	Fréjol	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A2 Raíz	Fréjol	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A2 Raíz	Fréjol	BG11	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A2 Raíz	Fréjol	BG11	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A 2 Suelo	Fréjol	Nitrofoska	<i>Nostoc</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A2 Suelo	Fréjol	BG11	<i>Anabaena</i> sp.
A3 Raíz	Haba	Nitrofoska	<i>Anabaena</i> sp.
A3 Raíz	Haba	Nitrofoska	<i>Anabaena</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.
A3 Raíz	Haba	BG11	<i>Lyngbya</i> sp.
A3 Raíz	Haba	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Navícula</i> sp.
A3 Suelo	Haba	Nitrofoska	<i>Lyngbya</i> sp.
A3 Suelo	Haba	BG11	<i>Nostoc</i> sp.
A4 Raíz	Chocho	Nitrofoska	<i>Chlorella</i> sp.
A4 Raíz	Chocho	Nitrofoska	<i>Chlorella</i> sp.
A4 Raíz	Chocho	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A4 Raíz	Chocho	BG11	<i>Nostoc</i> sp.
A4 Suelo	Chocho	Nitrofoska	<i>Lyngbya</i> sp.
A4 Suelo	Chocho	BG11	<i>Anabaena</i> sp.
A5 Raíz	Arveja	Nitrofoska	<i>Anabaena</i> sp.
A5 Raíz	Arveja	Nitrofoska	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A5 Raíz	Arveja	BG11	<i>Lyngbya</i> sp.
A5 Raíz	Arveja	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A5 Suelo	Arveja	Nitrofoska	<i>Nostoc</i> sp.
A5 Suelo	Arveja	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A6 Raíz	Fréjol	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Pediastrum</i> sp.
A6 Raíz	Fréjol	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Pediastrum</i> sp.
A6 Raíz	Fréjol	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Pseudanabaena</i> sp.
A6 Raíz	Fréjol	BG11	<i>Pediastrum</i> sp.
A6 Suelo	Fréjol	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A6 Suelo	Fréjol	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A7 Raíz	Haba	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A7 Raíz	Haba	Nitrofoska	<i>Lyngbya</i> sp.
A7 Raíz	Haba	BG11	<i>Lyngbya</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A7 Raíz	Haba	BG11	<i>Pseudanabaena</i> sp.
A7 Suelo	Haba	Nitrofoska	<i>Chlamydomona</i> sp.

A7 Suelo	Haba	BG11	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A8 Raíz	Haba	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp.
A8 Raíz	Haba	Nitrofoska	<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Phormidium</i> sp.
A8 Raíz	Haba	BG11	<i>Navícula</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A8 Raíz	Haba	BG11	<i>Navícula</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Calothrix</i> sp.
A8 Suelo	Haba	Nitrofoska	<i>Navícula</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.
A8 Suelo	Haba	BG11	<i>Navícula</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp.

## 4.2 Consorcios de cianobacterias

### 4.2.1 Cianobacterias aisladas

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno que se aislaron e identificaron taxonómicamente, fueron *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. (Komarék & Anagnostidis, 1999). Además, de que se caracterizaron por ser las más abundantes y presentes en la mayor parte de las muestras que fueron seleccionadas para el ensayo en suelos agrícolas.

Después de múltiples siembras por agotamiento, se aisló 3 cepas del género *Anabaena* sp. denominadas C1, C5 y C6, las mismas que fueron seleccionadas por su capacidad de adaptabilidad a las condiciones del sistema de cultivo.

### 4.2.2 Evaluación de las condiciones del consorcio de cianobacterias previo a su inoculación

#### 4.2.2.1 Pigmentos

La media del contenido de clorofila *a* y carotenoides del cultivo final del consorcio de cianobacterias previo a ser inoculado en los suelos fue de  $1.96 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  y  $2.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectivamente.

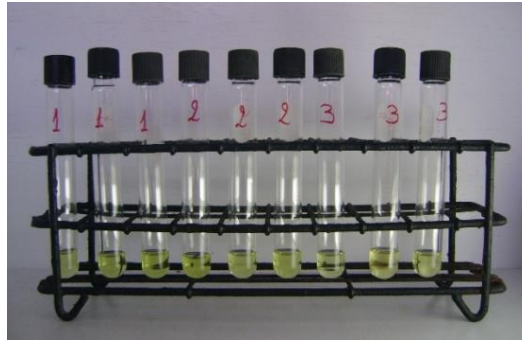


Figura 10. Pigmentos liposolubles de los consorcios.

Asimismo la media de la evaluación de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina del consorcio de cianobacterias fue de  $1.87 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $1.83 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  y  $1.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectivamente.



Figura 11. Pigmentos hidrosolubles del consorcio.

#### 4.2.2.2 Densidad celular

Los resultados de la evaluación del crecimiento del consorcio mediante turbidez demostraron que las cianobacterias poseen la capacidad diazotrófica de crecimiento (Whitton, 1992). Es decir, con solo la adición del medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>, carente de fuentes nitrogenadas, se produjo una biomasa significativa del consorcio con una densidad óptica de 1.36 a 750nm, al final del ensayo. Tan solo con el nitrógeno aportado por la aireación proveniente del compresor suministrado para agitación del cultivo, se obtuvo dicho crecimiento. Además, de que el medio BG-11<sub>0</sub> constituye un medio selectivo

exclusivo para cianobacterias con capacidad de fijar nitrógeno, no permitiendo el crecimiento de otros microorganismos dependientes de otras fuentes de nitrógeno.

### 4.3 Análisis de viabilidad de las cianobacterias en el suelo

Al evaluar la viabilidad de géneros en los consorcios inoculados en el suelo, se destacó una alta y continua presencia de *Anabaena* sp. hasta el final del ensayo, seguida de la microalga *Chlamydomonas* sp.. También, hubo la presencia de las cianobacterias *Chroococcus* sp., *Lynbya* sp. y *Nostoc* sp., además de, las microalgas *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp. con lo cual se demuestra la sucesión de especies a medida que van cambiando las condiciones del suelo en relación a la disponibilidad de nutrientes, temperatura, flora bacteriana asociada, iluminación y pH (Morales Avendaño, 2011) (Sánchez, Benintende, & Benintende, 2011). Es de notable importancia también la interacción biológica que existe entre los géneros de cianobacterias con microalgas.

A partir del día ocho, en la primera toma de muestras del suelo inoculado con los diferentes tratamientos, se observó la presencia de cianobacterias en ciertos tratamientos como lo indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día ocho.

Tratamientos	Código	Ausencia/Presencia de Cianobacterias
Testigo (Agua destilada)	TE1	Ausencia
Testigo (Agua destilada)	TE2	Ausencia
Testigo (Agua destilada)	TE3	Ausencia
Consortio de cianobacterias	TCC1	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC2	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC3	Presencia
Fertilizante químico	TFQ1	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ2	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ3	Ausencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF1	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF2	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF3	Presencia

En los tratamientos que evidenciaron una presencia de cianobacterias se pudieron identificar sus diferentes géneros y cuantificarlos por números.

Como muestra la figura 20, en el primer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias # 1, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp. y *Chroococcus* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp.

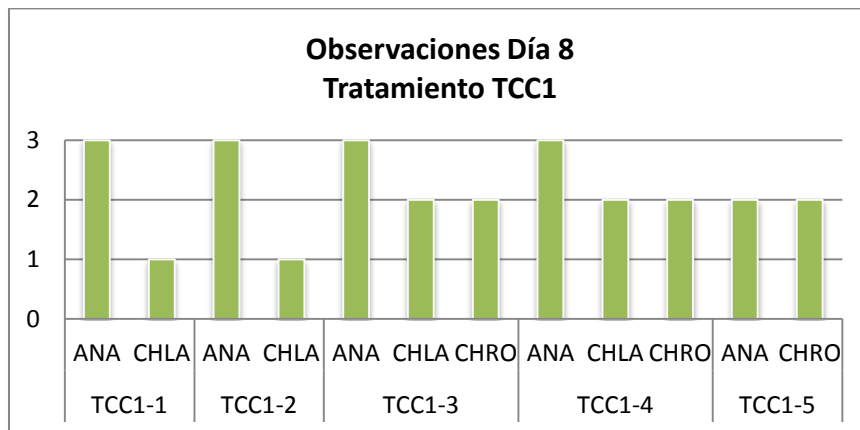


Figura 12. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día ocho.

Como muestra la figura 21, en el primer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias # 2, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp. y *Nostoc* sp., y microalgas del género *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

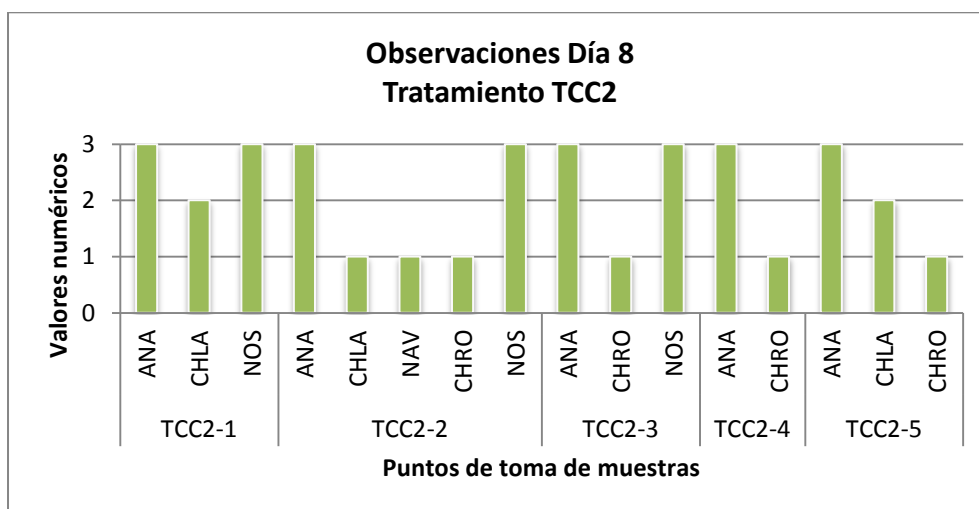


Figura 13. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día ocho.

Como muestra la figura 22, en el primer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias # 3, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., y *Nostoc* sp., y microalgas *Chlamydomonas* sp.

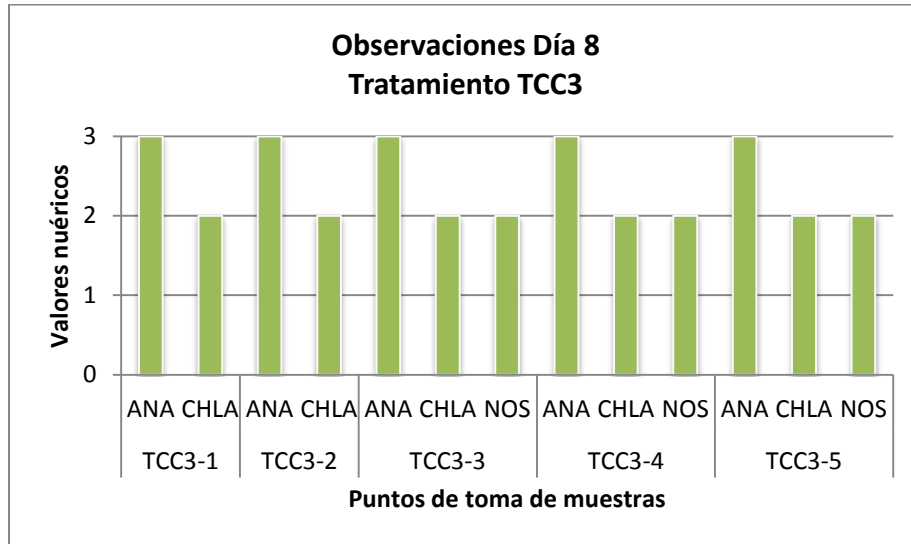


Figura 14. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día ocho.

Como muestra la figura 23, en el primer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* spp., *Chroococcus* sp. y *Nostoc* sp., y microalgas del género *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

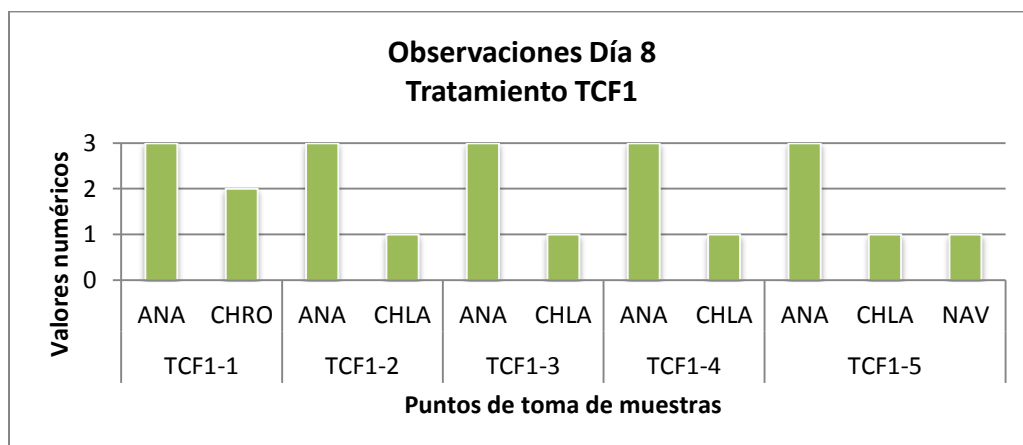


Figura 15. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día ocho.

Como muestra la figura 24, en el primer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #2, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., y microalgas *Chlamydomonas* sp.

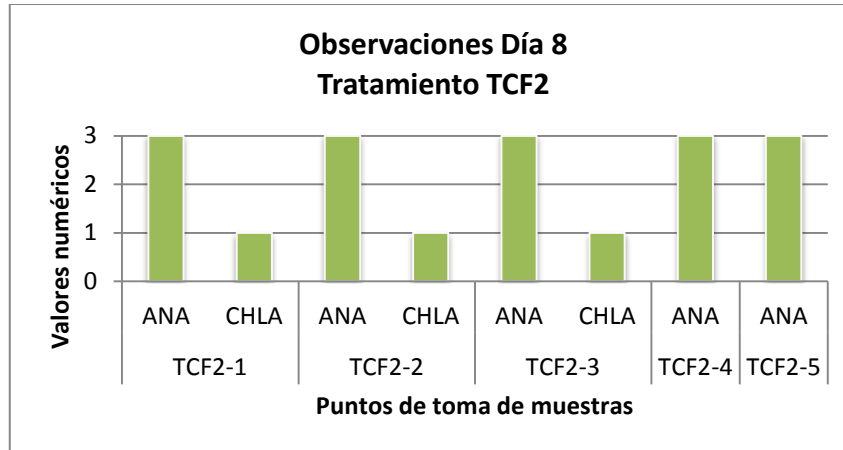


Figura 16. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día ocho.

Como muestra la figura 25, en el primer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #3 se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp.

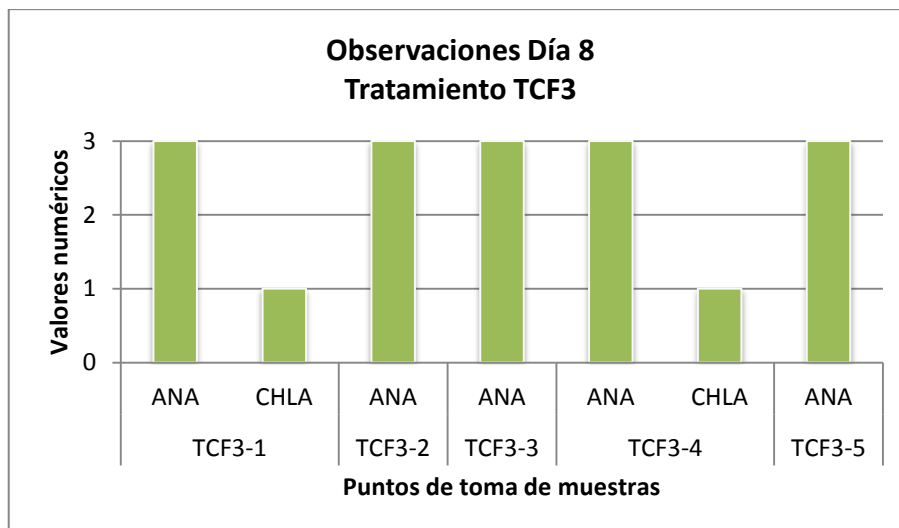


Figura 17. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día ocho.

En el día quince, en la segunda toma de muestras del suelo inoculado con los diferentes tratamientos, tampoco se observó la presencia de cianobacterias en todos los tratamientos como lo indica en la tabla 10.

Tabla 10. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día quince.

<b>Tratamientos</b>	<b>Código</b>	<b>Ausencia/Presencia de Cianobacterias</b>
Testigo (Agua destilada)	TE1	Ausencia
Testigo (Agua destilada)	TE2	Ausencia
Testigo (Agua destilada)	TE3	Ausencia
Consortio de cianobacterias	TCC1	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC2	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC3	Presencia
Fertilizante químico	TFQ1	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ2	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ3	Ausencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF1	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF2	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF3	Presencia

Se identificaron los taxa de cianobacterias y microalgas presentes en los tratamientos con presencia de biofilms y se los cuantificó por números.

Como muestra la figura 26, en segundo muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp. y *Nostoc* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* spp.

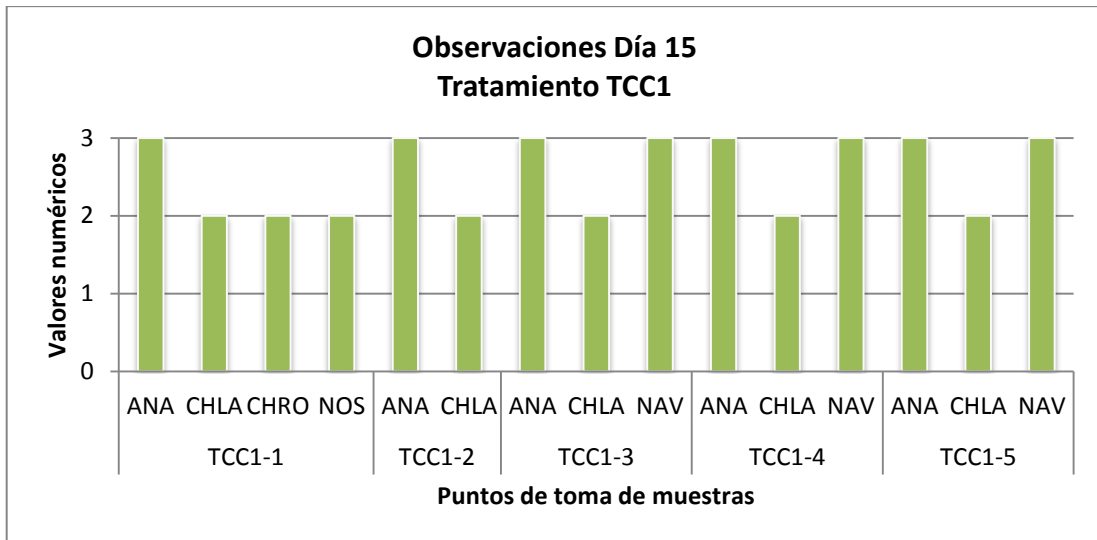


Figura 18. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día quince.

Como muestra la figura 27, en segundo muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #2, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp. y *Nostoc* sp. y microalgas del género *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

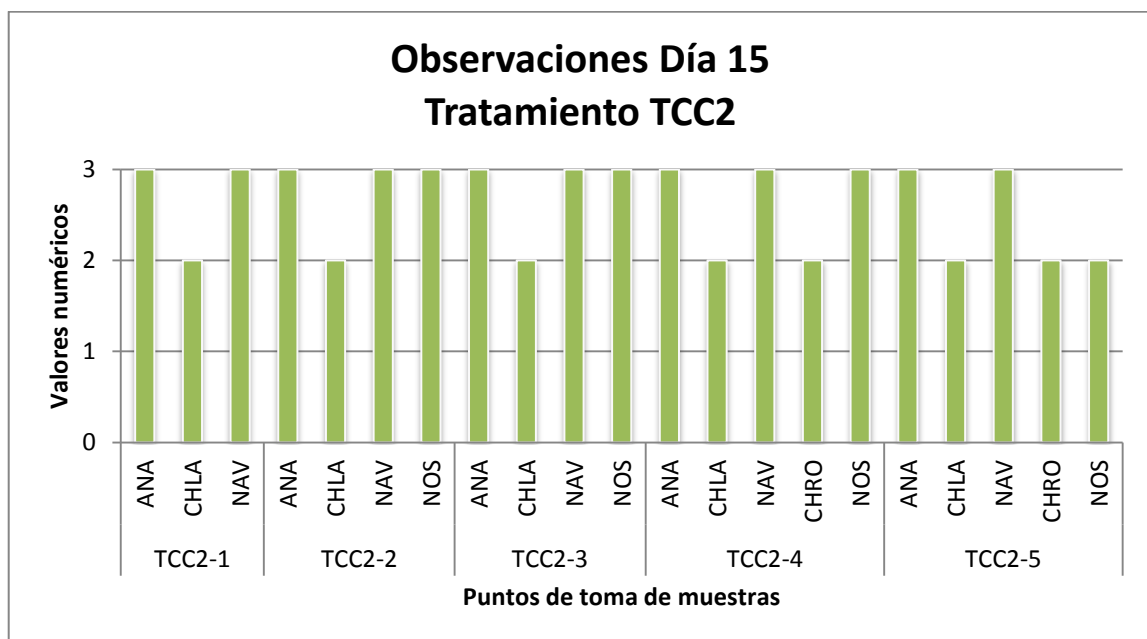


Figura 19. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día quince.

Como muestra la figura 28, en segundo muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #3, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

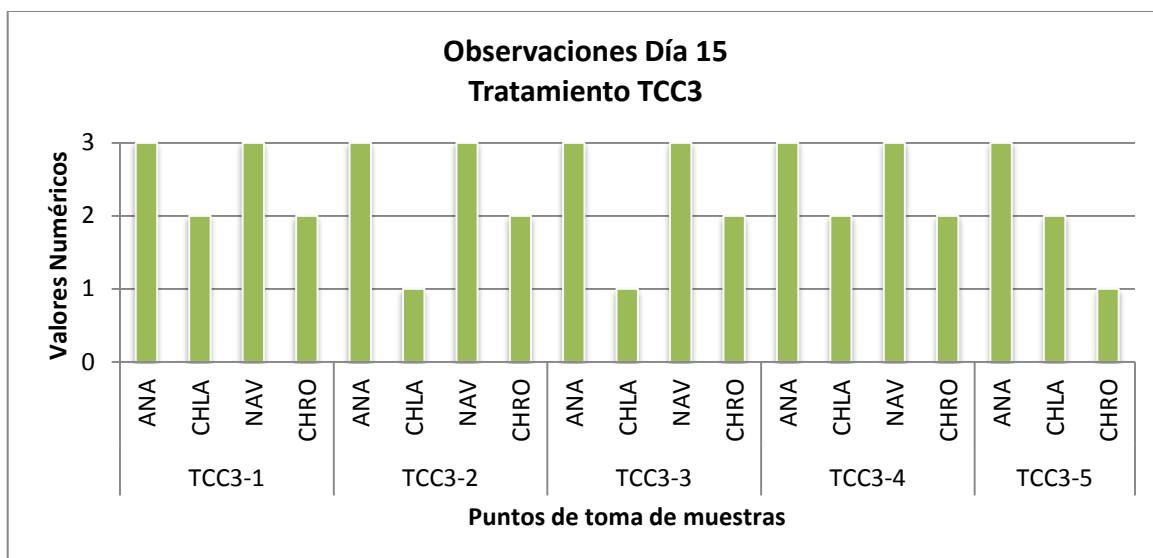


Figura 20. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día quince.

Como muestra la figura 29, en segundo muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

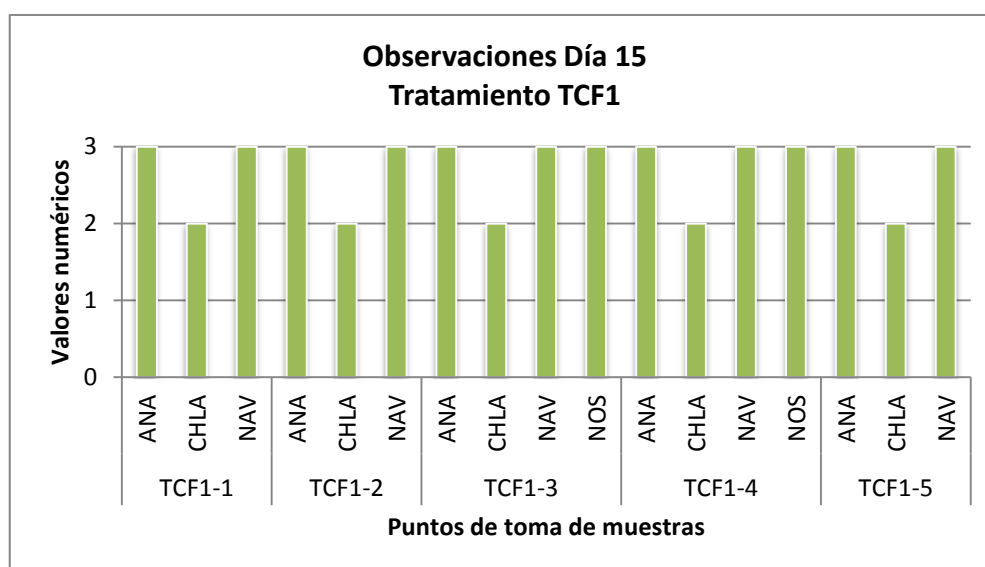


Figura 21. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día quince.

Como muestra la figura 30, en segundo muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #2, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

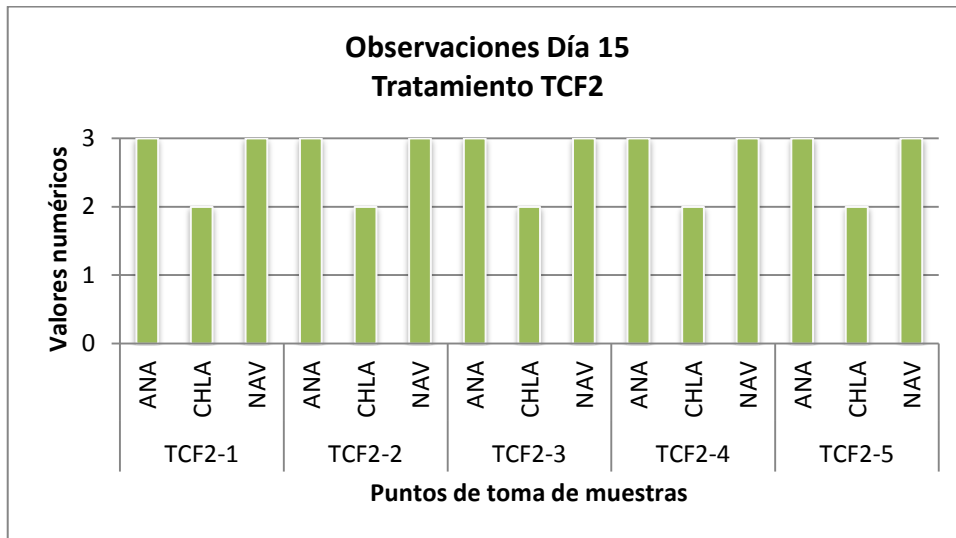


Figura 22. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día quince.

Como muestra la figura 31, en segundo muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #3, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

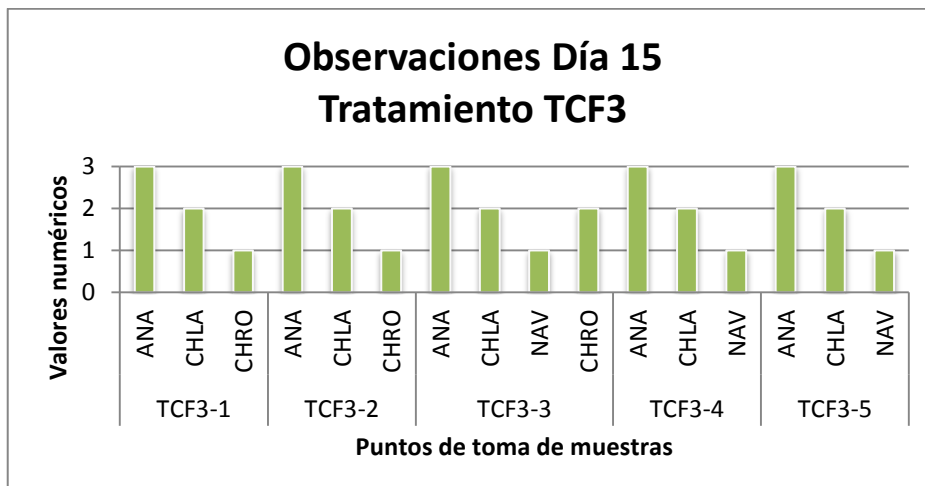


Figura 23. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día quince.

En el día veinte y dos, en la tercera toma de muestras del suelo inoculado con los diferentes tratamientos, se observó la presencia de cianobacterias en ciertos tratamientos como lo indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el veinte y dos.

Tratamientos	Código	Ausencia/Presencia de Cianobacterias
Testigo (Agua destilada)	TE1	Ausencia
Testigo (Agua destilada)	TE2	Ausencia
Testigo (Agua destilada)	TE3	Ausencia
Consortio de cianobacterias	TCC1	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC2	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC3	Presencia
Fertilizante químico	TFQ1	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ2	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ3	Ausencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF1	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF2	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF3	Presencia

Como muestra la figura 32, en tercer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

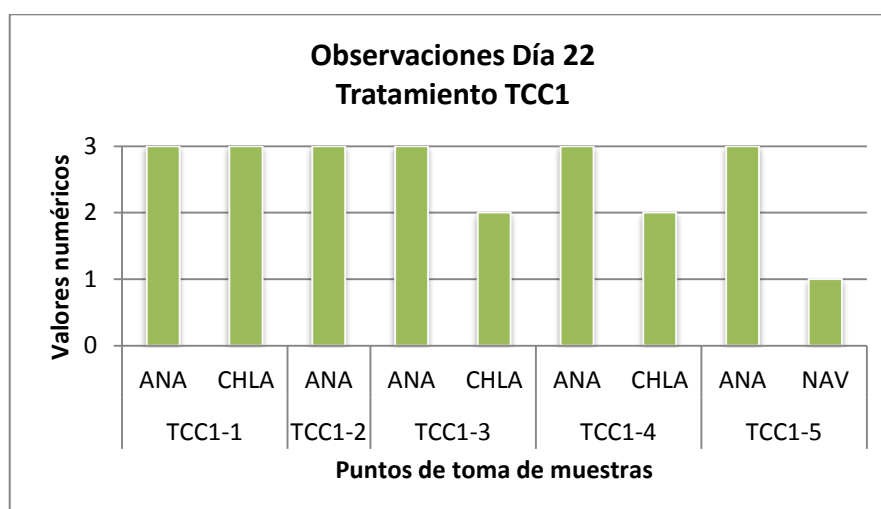


Figura 24. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día veinte y dos.

Como muestra la figura 33, en tercer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #2, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp, *Nostoc* sp., *Chroococcus* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

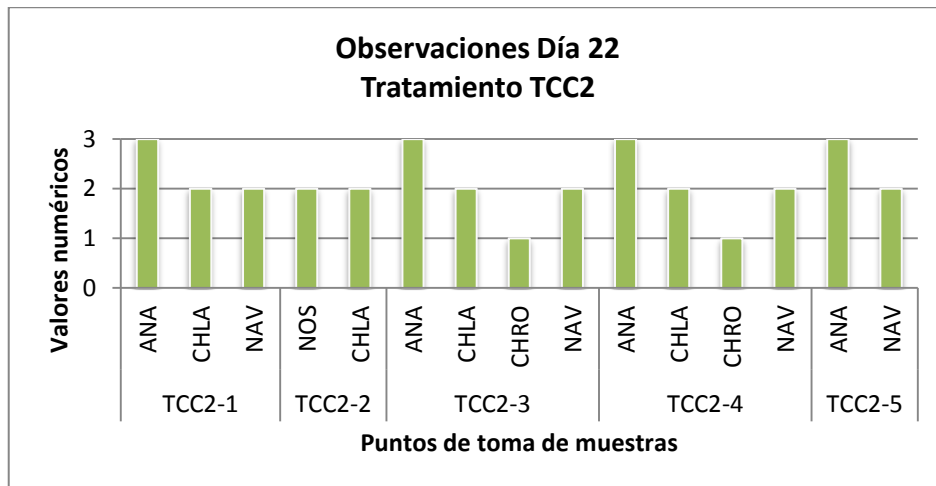


Figura 25. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día veinte y dos.

Como muestra la figura 34, en el tercer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #3 se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

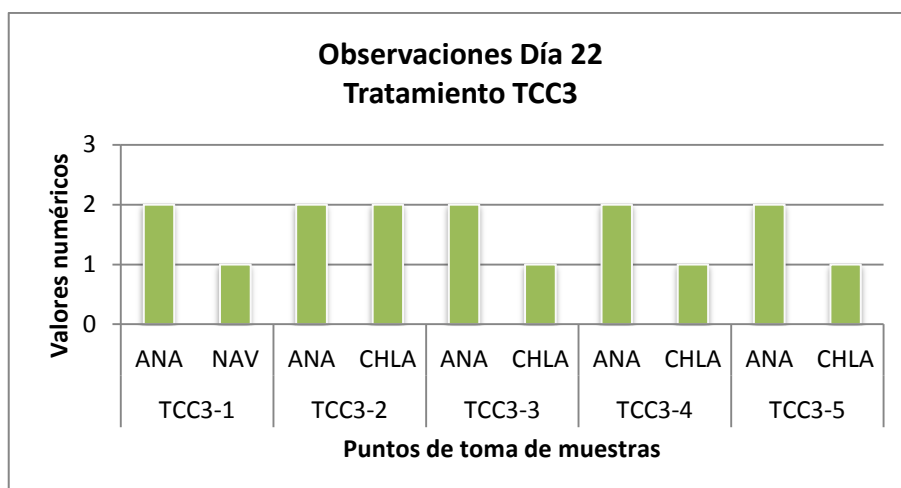


Figura 26. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día veinte y dos.

Como muestra la figura 35, en tercer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

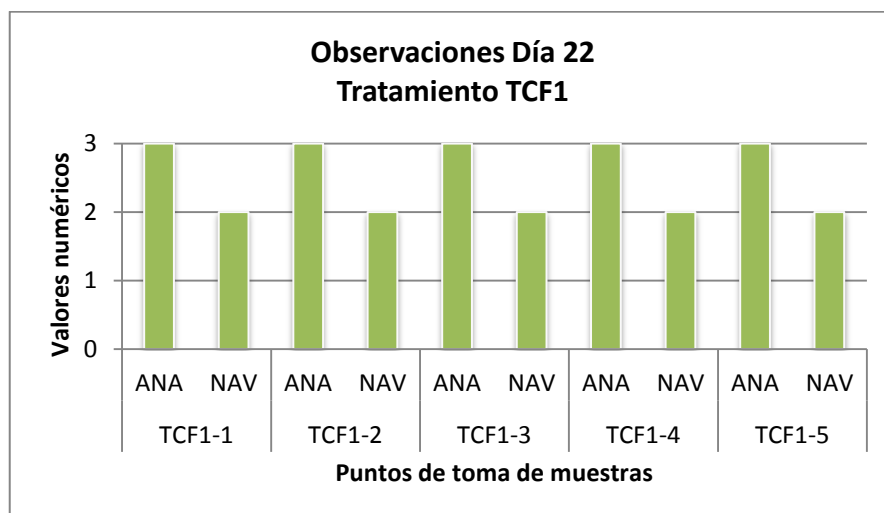


Figura 27. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día veinte y dos.

Como muestra la figura 36, en tercer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #2, se muestra una presencia de cianobacterias de los géneros *Anabaena* sp. y microalgas del género *Navícula* sp.

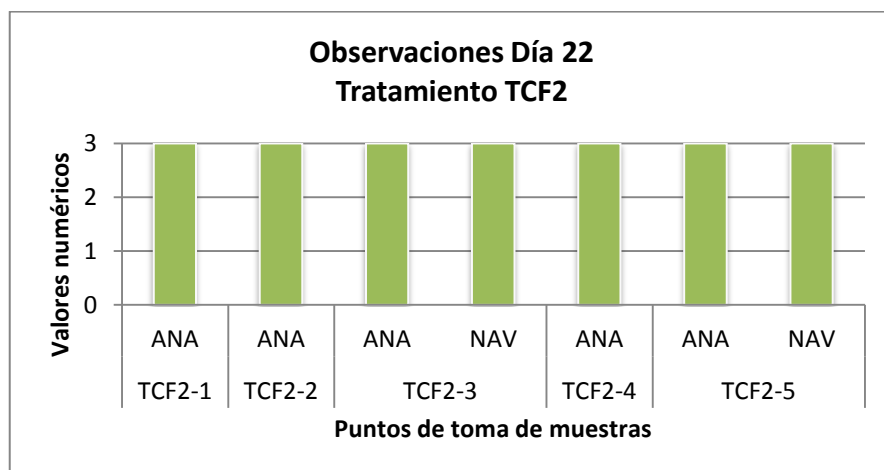


Figura 28. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día veinte y dos.

Como muestra la figura 37, en tercer muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #3, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp.

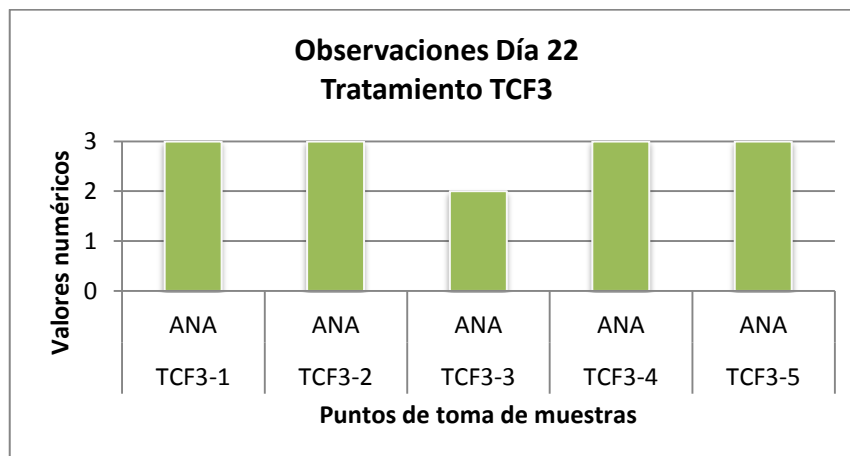


Figura 29. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día veinte y dos.

En el día veinte y nueve, en la cuarta toma de muestras del suelo inoculado con los diferentes tratamientos, se observó la presencia de cianobacterias en ciertos tratamientos como lo indica en la Tabla 12.

Tabla 12. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día veinte y nueve.

Tratamientos	Código	Ausencia/Presencia de Cianobacterias
Testigo (Agua destilada)	TE1	Presencia
Testigo (Agua destilada)	TE2	Presencia
Testigo (Agua destilada)	TE3	Presencia
Consorcio de cianobacterias	TCC1	Presencia
Consorcio de cianobacterias	TCC2	Presencia
Consorcio de cianobacterias	TCC3	Presencia
Fertilizante químico	TFQ1	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ2	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ3	Ausencia

Consorcio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF1	Presencia
Consorcio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF2	Presencia
Consorcio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF3	Presencia

Como muestra la figura 38, el cuarto muestreo del tratamiento testigo #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Lyngbya* sp., *Chroococum* sp. y microalgas *Nitzschia* sp.

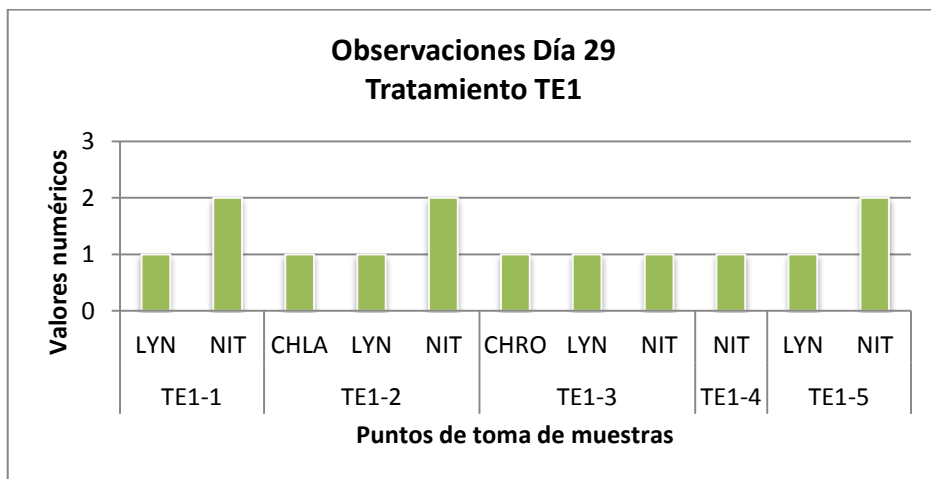


Figura 30. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE1 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 39, el cuarto muestreo del tratamiento testigo #2, se muestra una presencia de microalgas *Nitzschia* sp.

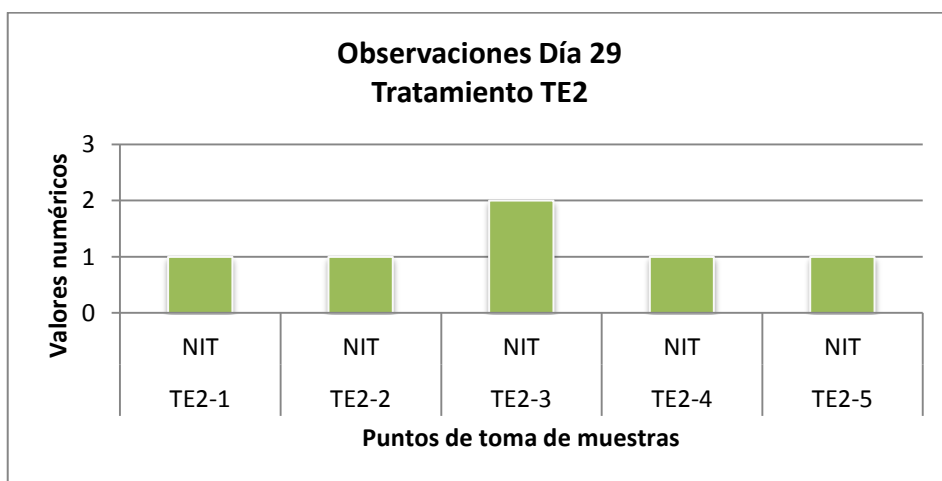


Figura 31. Microalgas presentes en el tratamiento TE2 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 40, el cuarto muestreo del tratamiento testigo #3, se muestra una presencia de cianobacterias *Lyngbya* sp. y microalgas *Nitzschia* sp. y *Navícula* sp.

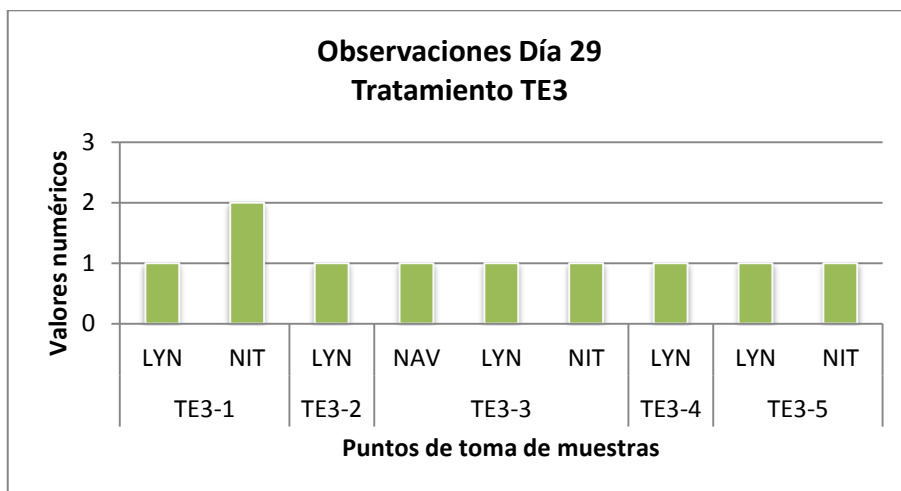


Figura 32. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE3 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 41, el cuarto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Lyngbya* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. , *Nitzschia* sp. y *Navícula* sp.

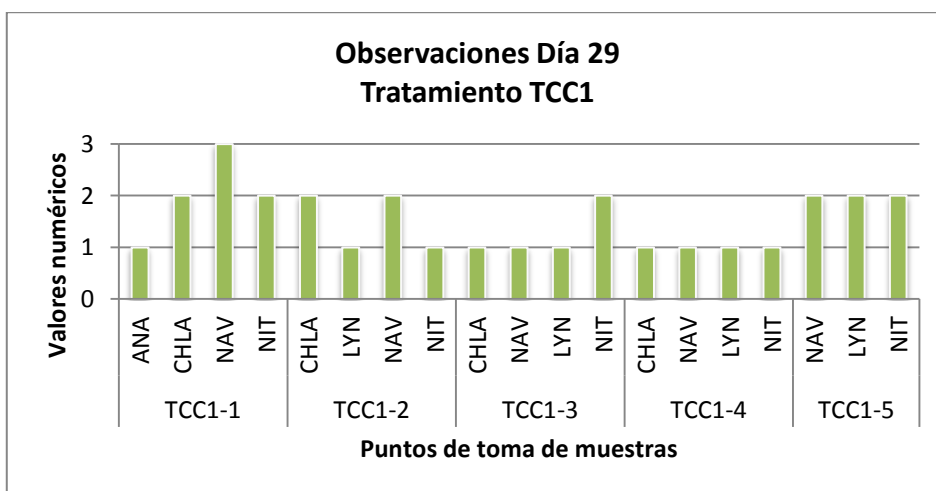


Figura 33. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 42, el cuarto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #2, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Navícula* sp.

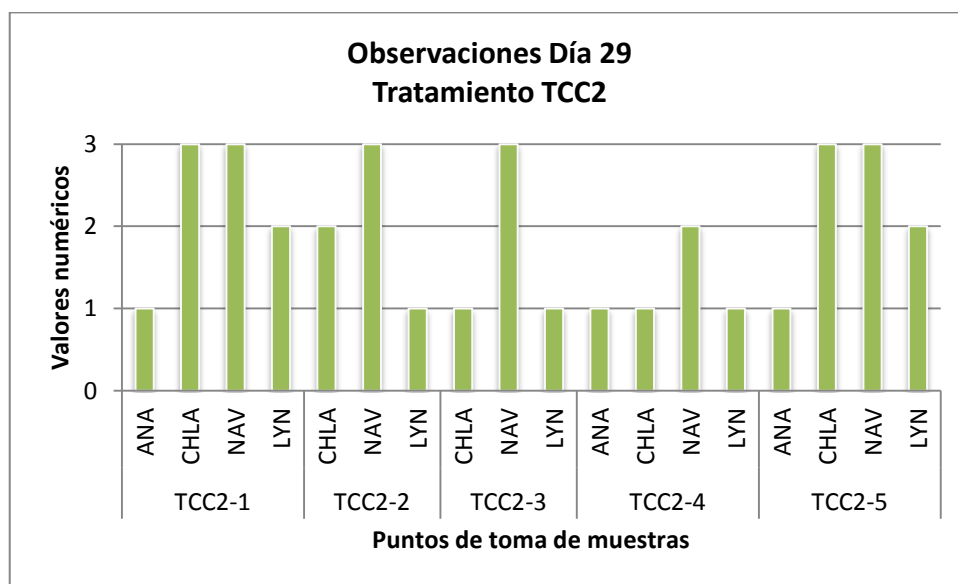


Figura 34. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 43, el cuarto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp., *Nitzschia* sp. y *Navícula* sp.

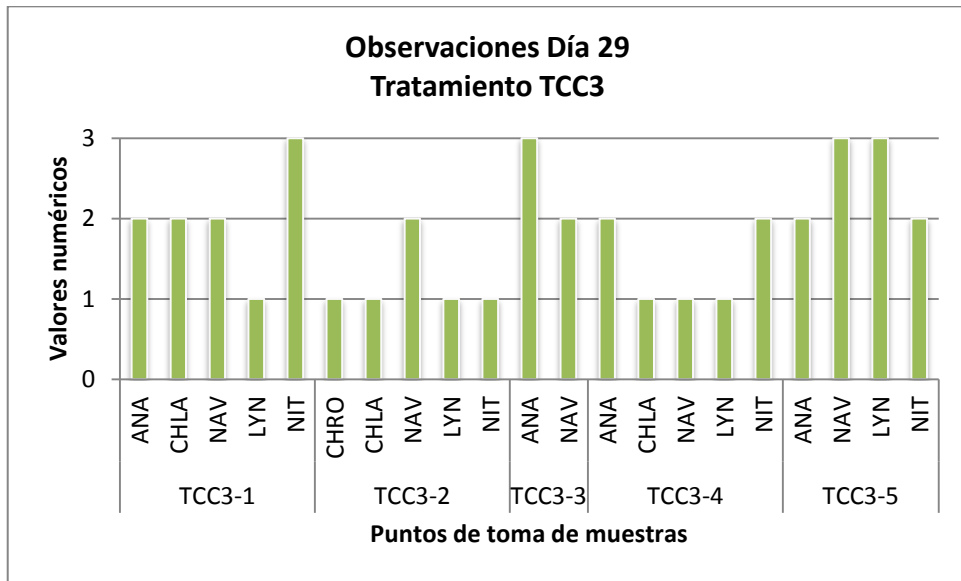


Figura 35. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 44, el cuarto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #1, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Nitzschia* sp. y *Navícula* sp.

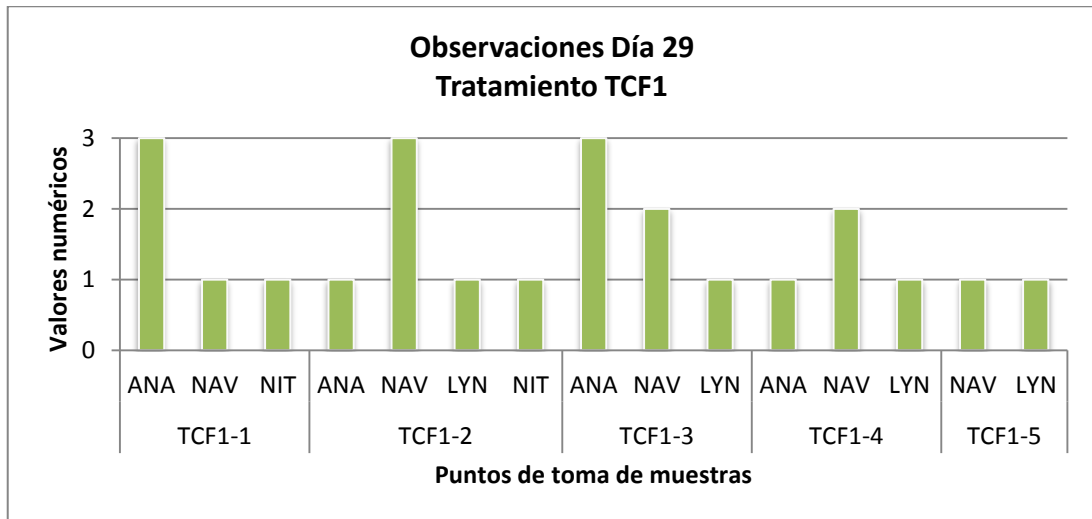


Figura 36. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 45, el cuarto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #2, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Nitzschia* sp. y *Navícula* sp.

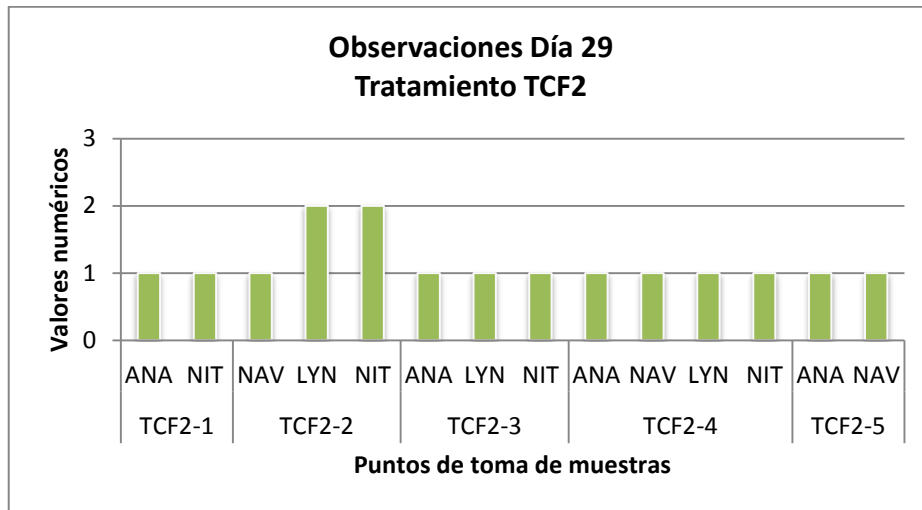


Figura 37. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día veinte y nueve.

Como muestra la figura 46, el cuarto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #3, se muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Nitzschia* sp. y *Navícula* sp.

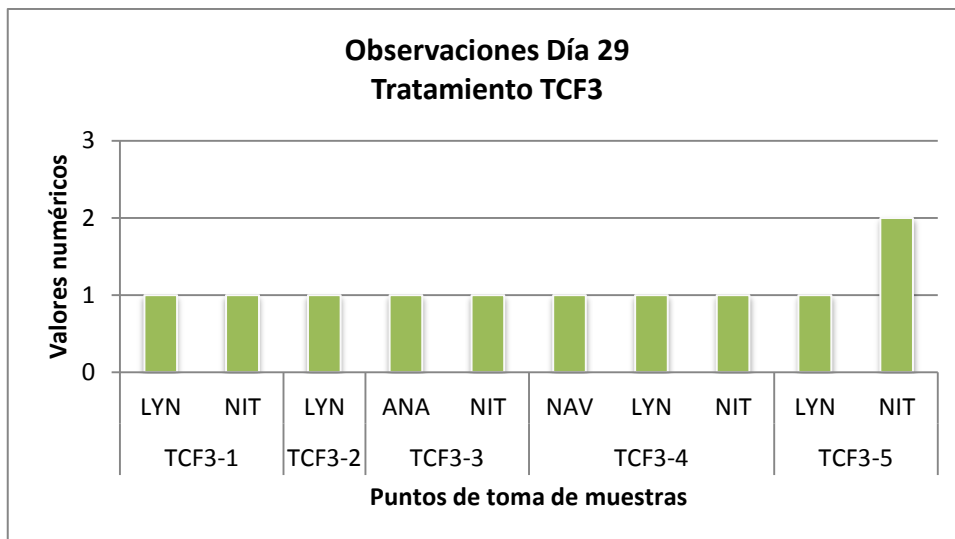


Figura 38. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día veinte y nueve.

En el día treinta y seis, en la quinta toma de muestras del suelo inoculado con los diferentes tratamientos, se observó la presencia de cianobacterias en ciertos tratamientos como lo indica en la Tabla 13.

Tabla 13. Tabla de resultados de ausencia o presencia de cianobacterias en los tratamientos inoculados en el día treinta y seis.

<b>Tratamientos</b>	<b>Código</b>	<b>Ausencia/Presencia de Cianobacterias</b>
Testigo (Agua destilada)	TE1	Presencia
Testigo (Agua destilada)	TE2	Presencia
Testigo (Agua destilada)	TE3	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC1	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC2	Presencia
Consortio de cianobacterias	TCC3	Presencia
Fertilizante químico	TFQ1	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ2	Ausencia
Fertilizante químico	TFQ3	Ausencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF1	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF2	Presencia
Consortio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF3	Presencia

En los tratamientos que evidenciaron presencia de cianobacterias se pudieron identificar sus diferentes géneros y cuantificarlos por números.

Como muestra la figura 47, el quinto muestreo del tratamiento testigo #1 muestra una presencia de cianobacterias *Lyngbya* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp. y *Nitzschia* sp.

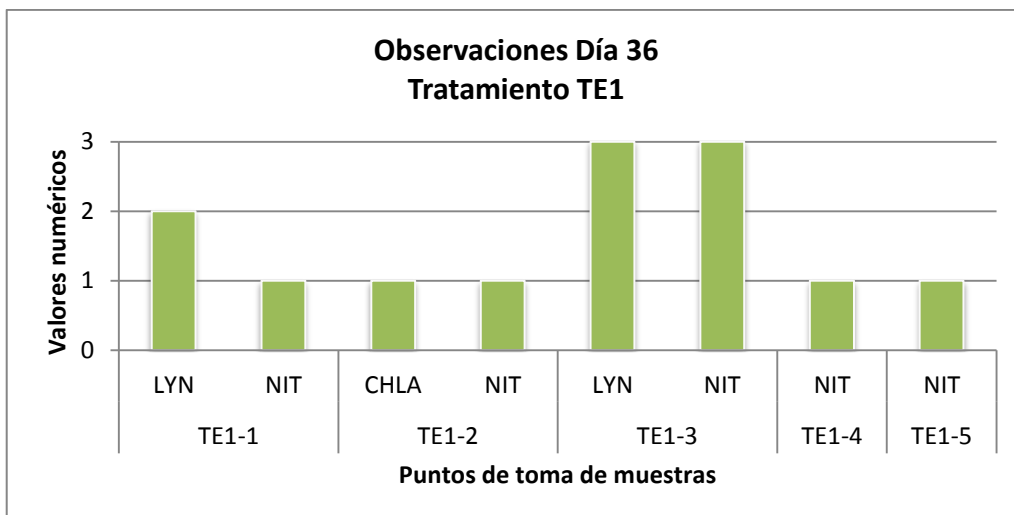


Figura 39. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE1 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 48, el quinto muestreo del tratamiento testigo #2, muestra una presencia de cianobacterias *Lyngbya* sp. y microalgas *Nitzschia* sp.

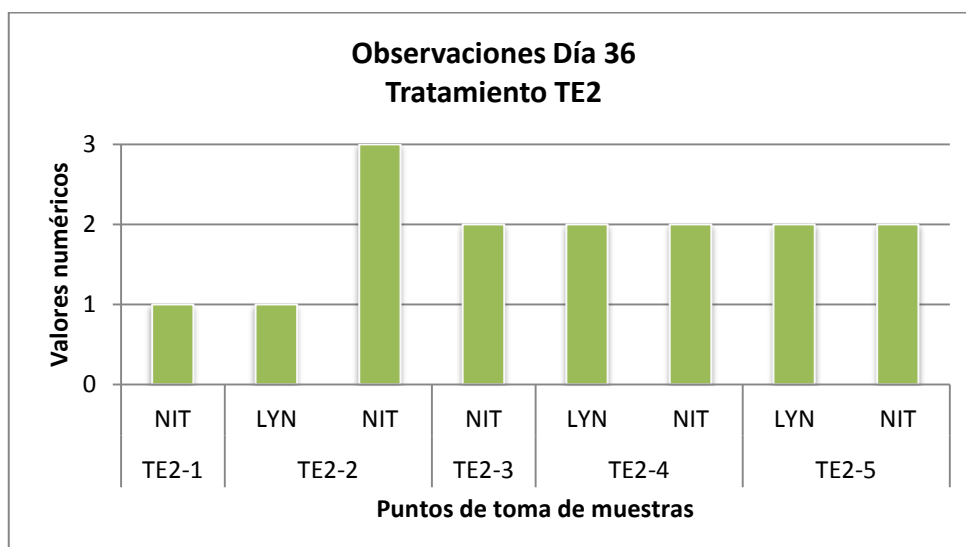


Figura 40. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE2 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 49, el quinto muestreo del tratamiento testigo #3, muestra una presencia de cianobacterias *Lyngbya* sp. y microalgas *Chalmydomonas* sp., *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp.

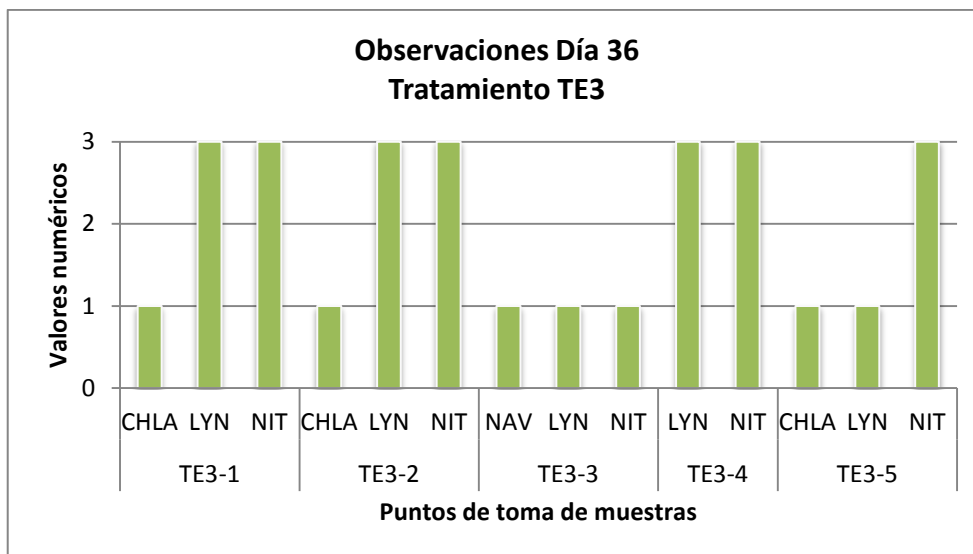


Figura 41. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TE3 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 50, el quinto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #1, muestra una presencia de las cianobacterias *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Chalmydomonas* sp., *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp.

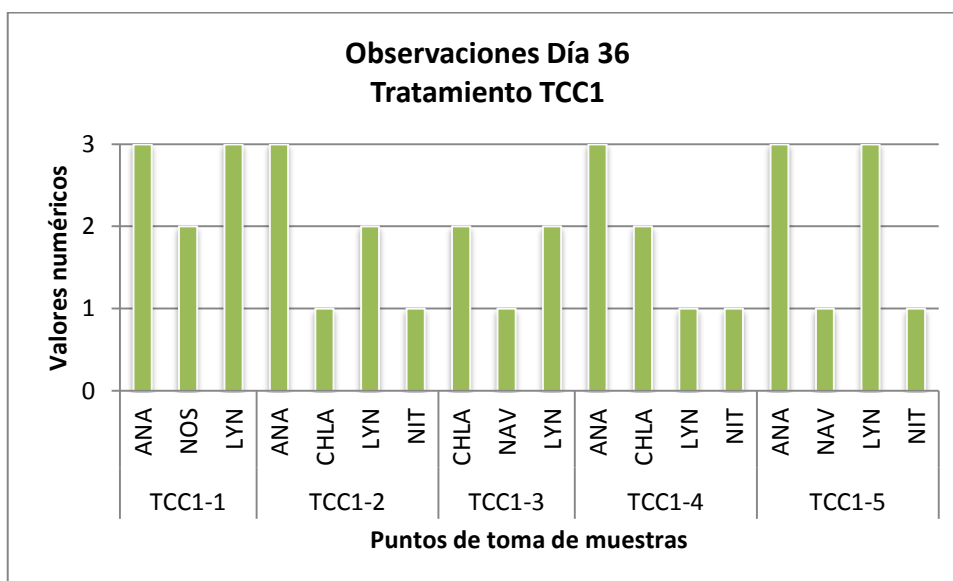


Figura 42. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC1 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 51, el quinto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #2, muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp., *Nostoc* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Chalmydomonas* sp. y *Navícula* sp.

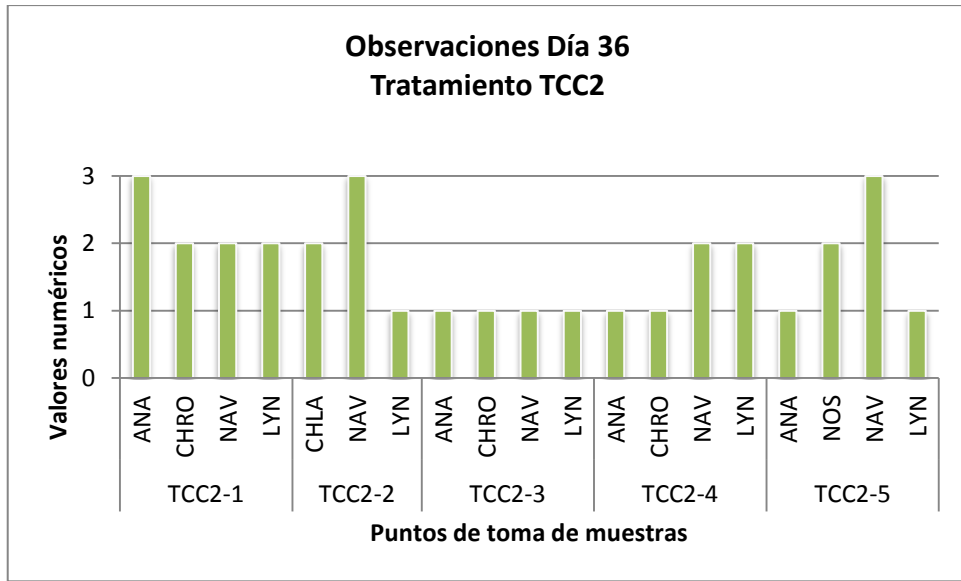


Figura 43. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC2 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 52, en el quinto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias #3, muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp, *Lyngbya* sp. y microalgas *Chalmydomonas* sp., *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp.

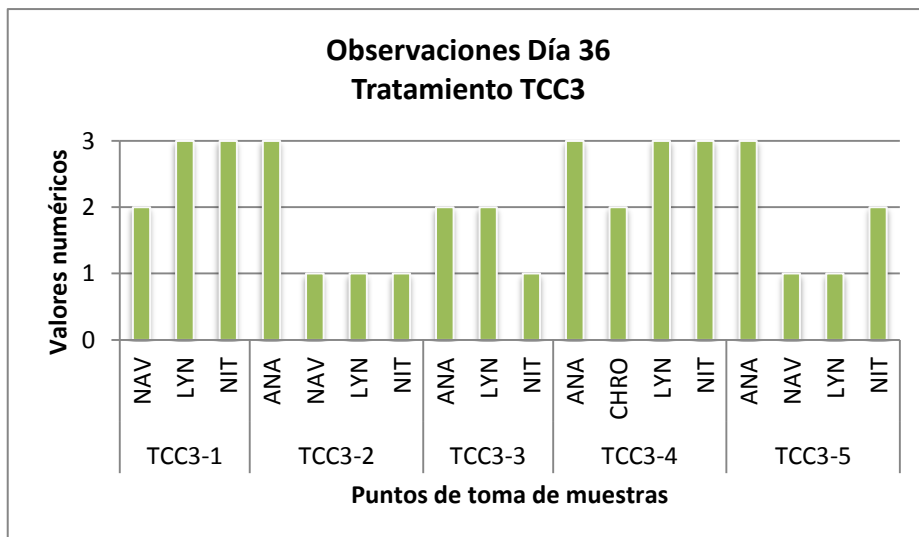


Figura 44. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCC3 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 53, el quinto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #1, muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp.

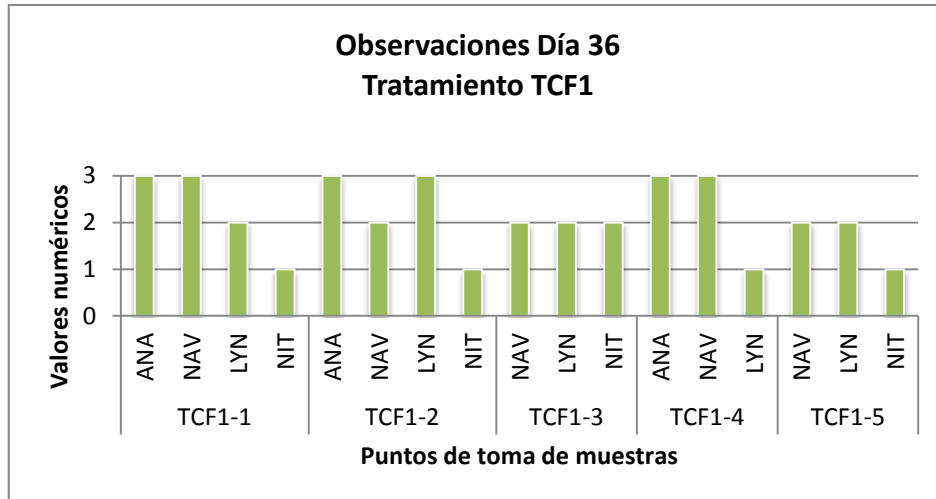


Figura 45. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF1 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 54, el quinto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #2, muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp.

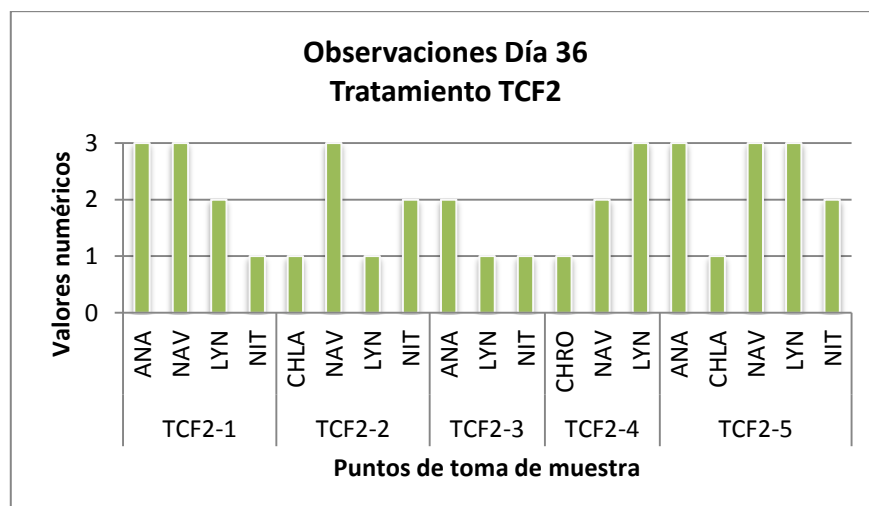


Figura 46. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF2 en el día treinta y seis.

Como muestra la figura 55, el quinto muestreo del tratamiento inoculado con cianobacterias + fertilizante químico #3, muestra una presencia de cianobacterias *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp., *Lyngbya* sp. y microalgas *Chlamydomonas* sp., *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp.

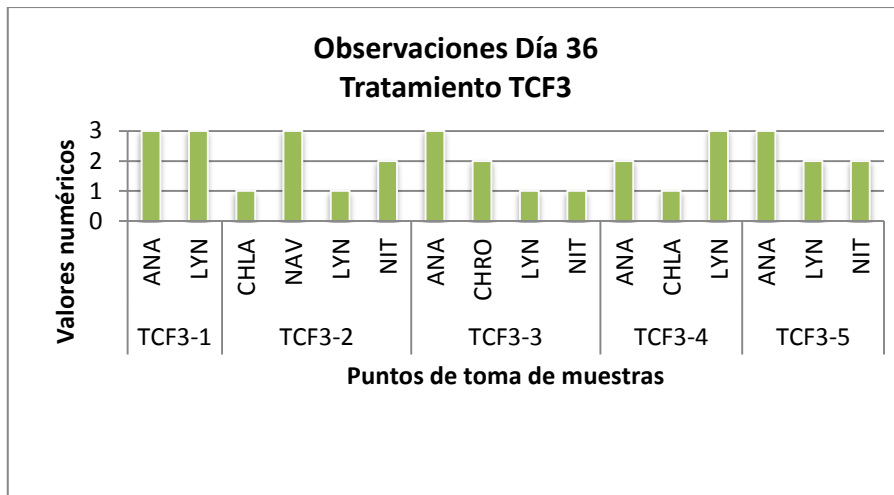


Figura 47. Microalgas y cianobacterias presentes en el tratamiento TCF3 en el día treinta y seis.

En la evaluación de la viabilidad, diversidad y frecuencia de géneros en los consorcios, se destacó la presencia tanto de cianobacterias como de microalgas hasta el día 36. A continuación un resumen de la presencia de estos microorganismos (Tabla 14):

Tabla 14. Microalgas y cianobacterias presentes en los tratamientos durante todo el período de estudio. MFNO: microorganismos fotosintéticos no observados

<b>Tratamiento</b>	<b>DIA 8</b>	<b>DIA 15</b>	<b>DIA 22</b>	<b>DIA 29</b>	<b>DIA 36</b>
<b>TCC</b>	<i>Anabaena</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Lyngbya</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Nitzschia</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Lyngbya</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp. <i>Nitzschia</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp.
<b>TFC</b>	<i>Anabaena</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Lyngbya</i> sp. <i>Nitzschia</i> sp. <i>Navícula</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Lyngbya</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp. <i>Nitzschia</i> sp.
<b>TE</b>	<b>MFNO</b>	<b>MFNO</b>	<b>MFNO</b>	<i>Lyngbya</i> sp. <i>Chroococcus</i> sp. <i>Navícula</i> sp. <i>Nitzschia</i> sp.	<i>Lyngbya</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Navícula</i> sp. <i>Nitzschia</i> sp.
<b>TFQ</b>	<b>MFNO</b>	<b>MFNO</b>	<b>MFNO</b>	<b>MFNO</b>	<b>MFNO</b>

#### 4.4 Análisis químico del suelo

El análisis químico del suelo se evaluó utilizando una prueba estadística conocida como análisis de varianza ANOVA, que nos permite realizar una comparación entre los diferentes tratamientos. En el caso de los tratamientos que al realizar el ANOVA se obtuvo una significancia menor al 0.05, fue necesario identificar en qué tratamientos se ha producido las diferencias, para lo cual se utilizó los contrastes no planeados o contrastes *post-hoc* (Barón & Téllez, 2002).

Tabla 15. Tabla ANOVA de los tratamientos.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media	F	Sig.
ph	Entre grupos	.680	3	.227	1.410	.309
	Dentro de los grupos	1.287	8	.161		
	Total	1.968	11			
Materia Orgánica	Entre grupos	24.601	3	8.200	15.488	.001 <sup>NS</sup>
	Dentro de los grupos	4.236	8	.529		
	Total	28.837	11			
Nitrógeno Total	Entre grupos	.061	3	.020	14.125	.001 <sup>NS</sup>
	Dentro de los grupos	.012	8	.001		
	Total	.073	11			
Fósforo	Entre grupos	90.900	3	30.300	.598	.634
	Dentro de los grupos	405.467	8	50.683		
	Total	496.367	11			
Boro	Entre grupos	.627	3	.209	1.402	.311
	Dentro de los grupos	1.193	8	.149		
	Total	1.821	11			
Potasio	Entre grupos	.176	3	.059	3.897	.055
	Dentro de los grupos	.121	8	.015		
	Total	.297	11			
Calcio	Entre grupos	23.889	3	7.963	4.093	.049
	Dentro de los grupos	15.564	8	1.945		
	Total	39.453	11			
Magnesio	Entre grupos	1.152	3	.384	3.263	.080
	Dentro de los grupos	.941	8	.118		
	Total	2.093	11			
Hierro	Entre grupos	2065.929	3	688.643	2.629	.122

	Dentro de los grupos	2095.340	8	261.917		
	Total	4161.269	11			
Manganeso	Entre grupos	67.300	3	22.433	2.500	.133
	Dentro de los grupos	71.784	8	8.973		
	Total	139.085	11			
Cobre	Entre grupos	.087	3	.029	.312	.816
	Dentro de los grupos	.747	8	.093		
	Total	.834	11			
Zinc	Entre grupos	.631	3	.210	.654	.603
	Dentro de los grupos	2.575	8	.322		
	Total	3.206	11			
Azufre	Entre grupos	2960.683	3	986.894	3.942	.054
	Dentro de los grupos	2002.694	8	250.337		
	Total	4963.377	11			

NS= No existe diferencia significativa (menor a 0.05)

#### 4.4.1 pH

El pH es un factor importante en la evaluación del suelo debido a que regula sus propiedades químicas e influye sobre sus propiedades biológicas, ya que tanto las plantas como los microorganismos del suelo presentan un determinado intervalo de pH óptimo para su crecimiento, generalmente próximo a la neutralidad (Báscones, 2005).

El pH evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### 4.4.2 Materia orgánica

La materia orgánica influye positivamente en todas las propiedades del suelo, tanto físicas, químicas y biológicas. El contenido medio de materia orgánica en la parte superior de los suelos cultivados suele variar entre el 1 y 3 %. (Báscones, 2005).

Como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple y se evidenció que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para el análisis de materia orgánica, por lo tanto se realizó una prueba *post-hoc* (Tabla 16).

En la tabla 16 se muestran la media, desviación estándar y el intervalo de confianza para la media de cada tratamiento al 95% de confianza.

Tabla 16. Media de materia orgánica de los diferentes tratamientos.

Nombre del Tratamiento	Código	Media (%)	Desviación Standard	95% Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Tratamiento consorcio de cianobacterias	TCC	2.243	.376	1.406	3.081
Tratamiento consorcio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF	4.500	.376	3.663	5.337
Tratamiento testigo	TE	1.563	.376	.726	2.401
Tratamiento con fertilizante químico	TFQ	0.617	.376	-.221	1.454

El análisis *post-hoc* evidenció una diferencia entre TCF y TFQ, cuyas medias son 4.500 y 0.617, respectivamente. En líneas generales se puede atribuir a que el fertilizante químico ayudó a la sobrevivencia de las cianobacterias en el suelo, y estas a su vez constituyen un abono verde para el suelo contribuyendo a la formación de humus joven, de evolución rápida y, generalmente rico en nitrógeno (Báscones, 2005).

Tabla 17. Análisis de comparación múltiple de la materia orgánica de cada tratamiento.

(A) Nombre del tratamiento	(B) Nombre del tratamiento	(A-B) Diferencia de Medias	Significancia
TCC	TCF	-2.2567*	.011
	TE	.6800	.709
	TFQ	1.6267	.071
TCF	TCC	2.2567*	.011
	TE	2.9367*	.002
	TFQ	3.8833*	.000
TE	TCC	-.6800	.709
	TCF	-2.9367*	.002
	TFQ	.9467	.433
TFQ	TCC	-1.6267	.071
	TCF	-3.8833*	.000
	TE	-.9467	.433

Basado en medias observadas.  
El término errores= ,424.  
\*La diferencia de medias es significativa al 0.5% de nivel

#### 4.4.3 Nitrógeno

El nitrógeno mineral del suelo se presenta en forma amoniacal ( $N-NH_4^+$ ) y nítrica ( $N-NO_3^-$ ). Los cultivos asimilan tanto las formas nítricas como las amoniacales (Diéz, 1999).

Como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple y se evidenció que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para el análisis de materia orgánica, por lo tanto se realizó una prueba *post-hoc* (Tabla 18).

En la tabla 18 se muestran la media, desviación estándar y el intervalo de confianza para la media de cada tratamiento al 95% de confianza.

Tabla 18. Media de nitrógeno de los diferentes tratamientos.

Nombre del Tratamiento	Código	Media (%)	Desviación Standard	95% Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Tratamiento con consorcio de cianobacterias	TCC	.110	.020	.066	.154
Tratamiento con consorcio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF	.227	.020	.183	.270
Tratamiento testigo	TE	.080	.020	.036	.124
Tratamiento con fertilizante químico	TFQ	.033	.020	-.010	.077

El análisis *post-hoc* evidenció una diferencia entre TCF y TFQ, cuyas medias son 0.227 y 0.033, respectivamente. Estas evaluaciones del nitrógeno presente en el suelo evidencia que efectivamente la combinación del fertilizante químico con el consorcio de cianobacterias aporta el mayor contenido de nitrógeno al suelo.

Tabla 19. Análisis de comparación múltiple de nitrógeno de cada tratamiento

(A) Nombre del tratamiento	(B) Nombre del tratamiento	(A-B) Diferencia de Medias	Significancia
TCC	TCF	-.1167*	.012
	TE	.0300	.812
	TFQ	.0767	.112
TCF	TCC	.1167*	.012
	TE	.1467*	.003
	TFQ	.1933*	.000
TE	TCC	-.0300	.812
	TCF	-.1467*	.003

	TFQ	.0467	.484
TFQ	TCC	-.0767	.112
	TCF	-.1933*	.000
	TE	-.0467	.484
Basado en medias observadas. El término errores= ,001. *La diferencia de medias es significativa al 0.5% de nivel.			

#### 4.4.4 Fósforo

El fósforo en el suelo se encuentra combinado formando parte de diferentes fosfatos minerales y orgánicos (Báscones, 2005).

El fósforo evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### 4.4.5 Boro

En los suelos ácidos existe mayor cantidad de boro asimilable para las plantas, mientras que en los suelos con un alto contenido de caliza disminuye la disponibilidad del boro (Báscones, 2005).

El boro evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### 4.4.6 Potasio

En la fracción mineral del suelo existe potasio combinado en diferentes silicatos que forman parte de las rocas de origen magmático y de las arcillas. También aparece potasio en compuestos de origen sedimentario, en forma de cloruros y sulfatos que, por su menor dureza y mayor solubilidad, se meteorizan más fácilmente que los silicatos (Báscones, 2005). La importancia de su presencia en el suelo se debe a que activa más de 60 enzimas que participan en los procesos metabólicos de la vida (Sánchez, 2003).

El potasio evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### **4.4.7 Calcio**

El calcio en el suelo se encuentra combinado en compuestos minerales y orgánicos. Aunque la mayoría de los suelos contienen suficiente disponibilidad de Ca para las plantas, la deficiencia puede darse en los suelos tropicales muy pobres en Ca. Sin embargo, el objetivo de la aplicación de Ca es usualmente el del encalado, es decir reducir la acidez del suelo (Diéz, 1999).

El calcio evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### **4.4.8 Magnesio**

El magnesio se encuentra en el suelo principalmente en forma mineral como silicatos, carbonatos, sulfatos y cloruros (Báscones, 2005).

El magnesio evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### **4.4.9 Hierro**

Generalmente los suelos están bien provistos de hierro pero se producen en las plantas estados carenciales por inactivación del  $Fe^{2+}$ . Se trata en la mayoría de las ocasiones de carencias inducidas o secundarias, conocidas como clorosis por ser, precisamente, la falta de clorofila el síntoma manifiesto (Báscones, 2005).

El hierro evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### **4.4.10 Manganese**

Interviene en los procesos de absorción iónica, fotosíntesis, respiración, control hormonal y síntesis de proteínas (Báscones, 2005).

El manganeso evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### **4.4.11 Cobre**

El cobre en el suelo esta principalmente adsorbido a la materia orgánica, a los óxidos de hierro y manganeso así como también está fijado en la red cristalina que es la base estructural directa de los silicatos del suelo. Además puede ser precipitado como hidróxido, carbonato o fosfato. La concentración de cobre en la solución del suelo depende del contenido de materia orgánica y el pH (Sánchez, 2003).

El cobre evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### **4.4.12 Zinc**

El zinc disponible en la solución del suelo es adsorbido/fijado especialmente por la materia orgánica del suelo. Además es adsorbido por los óxidos de hierro, aluminio y manganeso o fijado en la red de minerales arcillosos y silicatos. Una fijación adicional del zinc ocurre cuando el contenido de sulfatos y fosfatos en la solución del suelo es alto. La disponibilidad de zinc es fuertemente influenciado por el pH y su contenido total en el suelo. La cantidad de zinc intercambiable disminuye con el aumento del pH y es muy bajo a partir de un pH (Sánchez, 2003).

El zinc evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### 4.4.13 Azufre

Forma parte estructural de los aminoácidos (cisteína, cistina, metionina, taurina), todas las proteínas, vitaminas y coenzimas, ésteres con polisacáridos. Interviene en los procesos de fotosíntesis, fijación de CO<sub>2</sub>, respiración, síntesis de grasas y proteínas, fijación simbiótica de nitrógeno (Sánchez, 2003).

El azufre evaluado de los diferentes tratamientos fue neutro y como se muestra en la tabla 15, se realizó una comparación múltiple evidenciando que no existe diferencia estadística significativa para las medias de cada tratamiento.

#### 4.5 Análisis de plántulas del suelo

En la etapa final del ensayo se evidenció en los diferentes tratamientos la presencia de pequeñas plántulas herbáceas (Figura 56), entre las que se destacaron *Pennisetum clandestinum*, *Barnadesia* sp.y *Trifolium repens* (Tabla 20). En líneas generales se puede deducir que la aparición de estas plántulas podría ser un indicativo de las condiciones favorables del suelo.

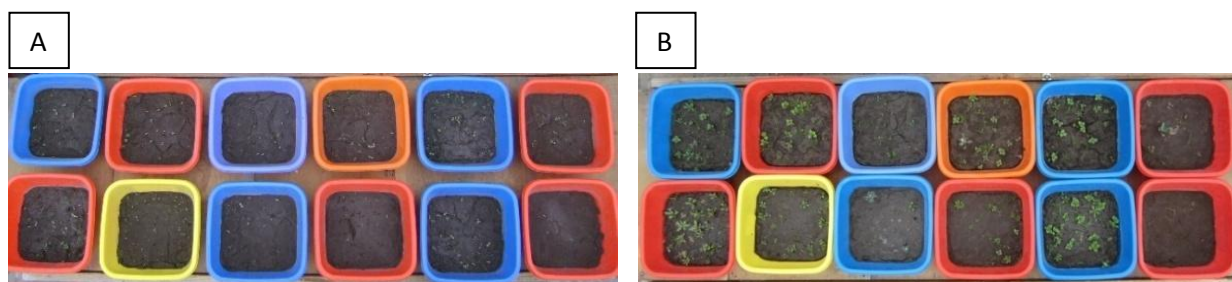


Figura 48. A) Tratamientos con presencia de plántulas herbáceas en el día 22. B) Tratamientos con presencia de plántulas herbáceas en el día 36.

Tabla 20. Especies de plantas que crecieron en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	CÓDIGO 1	PLANTA	NÚMERO	TOTAL	TOTAL POR TRATAMIENTO	
TESTIGO 1	TE1	<i>Pennisetum clandestinum</i>	9	29	80	
		<i>Barnadesia</i> sp.	2			
		<i>Coriandrum</i> sp.	9			
		<i>Chromolaena</i> sp.	9			
TESTIGO 2	TE2	<i>Pennisetum clandestinum</i>	5	18		
		<i>Barnadesia</i> sp.	1			
		<i>Coriandrum</i> sp.	3			
		<i>Chromolaena</i> sp.	9			
TESTIGO 3	TE3	<i>Pennisetum clandestinum</i>	2	33		
		<i>Barnadesia</i> sp.	24			
		<i>Coriandreae</i> sp.	4			
		<i>Chromolaena</i> sp.	3			
FERTILIZANTE QUIMICO 1	TFQ1	<i>Pennisetum clandestinum</i>	6	14	29	
		<i>Coriandrum</i> sp.	2			
		<i>Chromolaena</i> sp.	3			
		<i>Trifolium repens</i>	3			
FERTILIZANTE QUIMICO 2	TFQ2	<i>Pennisetum clandestinum</i>	2	2		
FERTILIZANTE QUIMICO 3	TFQ3	<i>Pennisetum clandestinum</i>	7	13		
		<i>Coriandrum</i> sp.	1			
		<i>Chromolaena</i> sp.	2			
		<i>Trifolium repens</i>	3			
CONSORCIO DE CIANOBACTERIAS 1	TCC1	<i>Pennisetum clandestinum</i>	7	35		111
		<i>Cichorium intybus</i>	1			
		<i>Barnadesia</i> sp.	24			
		<i>Coriandrum</i> sp.	1			
		<i>Chromolaena</i> sp.	2			
CONSORCIO DE CIANOBACTERIAS 2	TCC2	<i>Pennisetum clandestinum</i>	8	35		
		<i>Barnadesia</i> sp.	8			
		<i>Coriandrum</i> sp.	3			
		<i>Chromolaenasp.</i>	12			
		<i>Urtica urens sp</i>	1			
		<i>Trifolium repens</i>	3			

CONSORCIO DE CIANOBACTERIAS 3	TCC3	<i>Pennisetum clandestinum</i>	6	41	107
		<i>Cichorium intybus</i>	1		
		<i>Barnadesia sp.</i>	9		
		<i>Coriandrum sp.</i>	6		
		<i>Chromolaena sp.</i>	16		
		<i>Trifolium repens</i>	3		
CONSORCIO+ FERTILIZANTE QUIMICO 1	TCF1	<i>Pennisetum clandestinum</i>	10	38	107
		<i>Barnadesia sp.</i>	8		
		<i>Coriandrum sp.</i>	6		
		<i>Chromolaena sp.</i>	5		
		<i>Trifolium repens</i>	9		
CONSORCIO+ FERTILIZANTE QUIMICO 2	TCF2	<i>Pennisetum clandestinum</i>	12	35	
		<i>Barnadesia sp.</i>	4		
		<i>Coriandrum sp.</i>	5		
		<i>Chromolaena sp.</i>	10		
		<i>Urtica urens sp.</i>	1		
		<i>Trifolium repens</i>	3		
CONSORCIO+ FERTILIZANTE QUIMICO 3	TCF3	<i>Pennisetum clandestinum</i>	9	34	107
		<i>Barnadesia sp.</i>	11		
		<i>Coriandrum sp.</i>	7		
		<i>Chromolaena sp.</i>	7		

Para poder evaluar la presencia de éstas plantas y su posible relación con las condiciones nutricionales del suelo se procedió a cuantificar las plantas presentes en cada tratamiento y a realizar una comparación múltiple mediante un análisis de varianza ANOVA como lo muestra la tabla 21.

Tabla 21. Tabla ANOVA de las plantas que crecieron por cada tratamiento

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media	F	Sig.
Entre grupos	1374.000	3	458.000	15.395	.001
Dentro de los grupos	238.000	8	29.750		
Total	1612.000	11			

Como se muestra en la tabla 21, se realizó una comparación múltiple y se evidenció que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para el análisis de las plántulas que crecieron por cada tratamiento, por lo tanto se realizó una prueba *post-hoc* (Tabla 22).

Tabla 22. Media del número de plantas que crecieron por cada tratamiento.

Nombre del Tratamiento	Código	Media	Desviación Standard	95% Intervalo de confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Tratamiento con consorcio de cianobacterias	TCC	37.000	3.175	29.677	44.323
Tratamiento con consorcio de cianobacterias + fertilizante químico	TCF	35.667	3.175	28.344	42.989
Tratamiento testigo	TE	26.667	3.175	19.344	33.989
Tratamiento con fertilizante químico	TFQ	9.667	3.175	2.344	16.989

Como se muestra en la tabla 23, la comparación múltiple evidenció que hubo una diferencia significativa entre las plantas presentes en TCC y TFQ, cuyas medias son 37.000 y 9.667, respectivamente.

Tabla 23. Análisis de comparación múltiple del crecimiento de plantas de cada tratamiento.

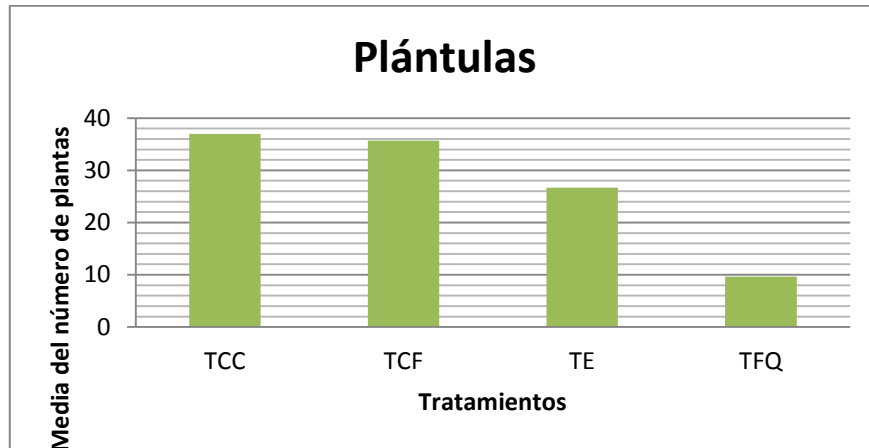
(A) Nombre del tratamiento	(B) Nombre del tratamiento	(A-B) Diferencia de Medias	Significancia
TCC	TCF	1.3333	.990
	TE	10.3333	.177
	TFQ	27.3333*	.001
TCF	TCC	-1.3333	.990
	TE	9.0000	.263
	TFQ	26.0000*	.002
TE	TCC	-10.3333	.177
	TCF	-9.0000	.263
	TFQ	17.0000*	.022
TFQ	TCC	-27.3333*	.001
	TCF	-26.0000*	.002
	TE	-17.0000*	.022

Basado en medias observadas.  
El término errores = 30,250.

\*La diferencia de medias es significativa al 0.5% de nivel.

Se encontró una variabilidad con respecto al número de plantas que crecieron en los diferentes tratamientos como se observa en la figura 57.

Figura 49. Media del número de plantas en los diferentes tratamientos.



## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

A partir de las muestras de suelos y de rizósferas de las plantas leguminosas: *Phaseolus vulgaris* (fréjol), *Vicia faba* (haba), *Lupinus bogotensis* (chocho) y *Pisum sativum* (arveja), se identificaron 7 taxa de microalgas (*Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. *Scenedesmus* sp. *Chlorococcum* sp. *Desmodesmus* sp. *Navícula* sp. y *Pediastrum* sp.) y 7 taxa de cianobacterias: *Nostoc* sp. *Calothrix* sp. *Anabaena* sp. *Phormidium* sp. *Pseudanabaena* sp. *Lyngbya* sp. y *Leptolyngbya* sp.; de las cuales 3 presentan heterocistos, como evidencia de ser fijadoras de nitrógeno corresponden a *Nostoc* sp. *Calothrix* sp. *Anabaena* sp.

En todas las muestras inoculadas con el fertilizante Nitrofoska y el medio de cultivo BG11 hubo crecimiento de microalgas y cianobacterias; pero con una mayor diversidad de microalgas en muestras de rizósfera de las leguminosas, inoculadas con el fertilizante y con presencia de *Chlamydomonas* sp., *Navícula* sp., *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp., *Pediastrum* sp. y de las cianobacterias, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Calothrix* sp., *Lyngbya* sp., *Pseudanabaena* sp. y *Leptolyngbya* sp. Mientras que, la microalga con la mayor frecuencia de observación en todas las muestras correspondió a *Chlamydomonas* sp., seguida de la cianobacteria *Lyngbya* sp. Aún cuando, el fertilizante comercial Nitrofoska estimuló el crecimiento de microalgas y cianobacterias; el uso del medio BG11 contribuyó de una manera más eficiente a la proliferación de cianobacterias fijadoras de nitrógeno y de otras sin heterocistos; además de condicionar la presencia de microalgas.

La presencia de microalgas y cianobacterias está demostrada en diferentes tipos de suelos tanto cultivados como no utilizados por el hombre (Metting, 1994). La distribución y la diversidad de microalgas y cianobacterias está influenciada por el contenido de nutrientes, pH, humedad, luz, tipo de manejo del suelo; de tal forma que pueden predominar las microalgas clorofitas, diatomeas o cianobacterias. Es así como, (Lin, Chou, & Wu, 2013) han reportado 74 taxa pertenecientes a 33 géneros de cianobacterias, diatomeas, clorofitas y euglenofitas, en relación a características morfológicas y secuenciación del rDNA, encontrando una amplia diversidad de microalgas y cianobacterias, pertenecientes a los géneros *Chlorella*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Pinnularia*, *Microcoleus*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Nostoc* y *Chlamydomonas*, entre otros.

La estructura, ecología y taxonomía de cianobacterias y microalgas edáficas en suelos de también ha sido descrita por (Salaru, Trofim, Melniciuc, & Donu, 2008), , la cual está relacionada con la presencia de ecobiormorfos, según la morfología de las diversas, tales como las filamentosas con o sin vaina mucilaginosas ó las cianobacterias fijadoras de nitrógeno, como *Anabaena*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*; las cuales son indicadoras de la fertilidad natural de suelos y en este sentido, la dinámica de la población de estas cianobacterias y de ciertas microalgas en suelos, dependerá del uso racional de los suelos para la agricultura o del uso excesivo de fertilizantes para el cultivo masivo de plantas de interés económico.

En el presente estudio, fueron identificadas y aisladas cepas de *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. y mantenidas en consorcios, también *Calothrix* sp.; lo que sugiere que los suelos cultivados con las leguminosas, son ricos en una diversidad de cianobacterias e incluso, con estas capaces de contribuir con la producción de biomasa enriquecida con fuentes nitrogenadas, como producto de la fijación del nitrógeno atmosférico. Estos resultados también son similares a los reportados por (Acosta, Santos, Silva, & Esparza, 1996), quienes identificaron en rizósfera de la leguminosa *Vigna unguiculata*, las cianobacterias: *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Nodularia* y varias especies de diatomeas pennadas. Tales cianobacterias parecen ser cosmopolitas y frecuentes en diversos tipos de suelos; con lo cual se presenta la factibilidad de aplicar las metodologías para su aislamiento, cultivo y producción de biomasa para fines agrícolas.

En relación a la producción del consorcio con las cianobacterias *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp., procedentes de las muestras de suelos y de rizósferas de las leguminosas evaluadas, y cultivadas en cultivos discontinuos alimentados en medio BG11 hasta alcanzar su escalamiento a un volumen de 45L, se logró establecer un protocolo para la producción y mantenimiento de consorcios con cianobacterias fijadoras de nitrógeno de acuerdo al tipo de suelo y rizósfera de su procedencia, medio de cultivo y condiciones de escalado de los cultivos discontinuos. Es de indicar que, al final del proceso de producción masiva del consorcio se obtuvo una proporción de los microorganismos integrantes: *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. y *Chlamydomonas* sp., de 3:1:3.

El cultivo de consorcios microbianos a gran escala permite incrementar la eficiencia de la producción de biomasa microalgal para biorremediación, biofertilizantes o producción de metabolitos de interés. Tal es el caso, sobre la obtención de un consorcio a partir de una proporción de 1:1:1:1 de cuatro cepas de *Nostoc calcicola*, *Nostoc spongiaeformae*, *Nostoc linckia* y *Nostoc muscorum*, aisladas de suelos y cultivadas en BG-11, para la producción de exopolisacáridos como la reducción de la salinidad en suelos y mejoramiento en la germinación de semillas de maíz, trigo y arroz (Arora, Kaushik, Rani, & Kaushik, 2010). El uso de cianobacterias como biofertilizantes de suelos y mediante consorcios, también ha sido descrita por (Amal, Hegazi, Mostafa, Hamdino, & Ahmed, 2010), quienes a partir de cianobacterias fijadoras de nitrógeno (*Nostoc muscorum*, *Nostoc humifusum*, *Anabaena oryzae* y *Wollea* sp) y de no fijadoras (*Phormidium* sp. y *Spirulina platensis*) cultivaron por separado cada una de estas en medio BG11 y *Spirulina platensis*, en medio Zarrouk, fueron luego combinadas en proporciones iguales en cuanto a volumen de cultivo hasta ser escalados y cosechados estos consorcios formados para ser inoculados a suelos (Amal, Hegazi, Mostafa, Hamdino, & Ahmed, 2010). De tal manera que, la metodología aplicada en la presente investigación para la producción del consorcio cianobacteria-microalga es avalada de acuerdo a las investigaciones ya descritas. Además, que la estabilidad de tales consorcios se ha demostrado mediante cultivos discontinuos alimentados con medio BG11<sub>0</sub> y durante 3 meses consecutivos y en el cual se mantienen las cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

La viabilidad del consorcio inoculado en los diferentes tratamientos del suelo y en función de la presencia de *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. y *Chlamydomonas* sp., quedó demostrada (Tabla 49), en virtud de que durante el período de los 36 días, en los cuales se evaluaron las muestras obtenidas de los suelos (a los 8, 15, 22, 29 y 36 días) se mantuvieron presentes las dos cianobacterias y la microalga en el tratamiento correspondiente al suelo inoculado con el consorcio (TCC). En cambio, en el suelo inoculado con el fertilizante + el consorcio (TFC), la cepa de *Anabaena* sp. persistió durante todo el experimento. Sin embargo, *Nostoc* aparentemente fue observado hasta el día 15. Mientras que, en el tratamiento no inoculado (TE) no fueron observadas las cianobacterias *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp., inoculadas en los tratamientos TCC y TFC. Esto demuestra una alta de viabilidad de las cianobacterias inoculadas e incluso de las microalgas *Chlamydomonas*; a pesar de que el volumen del inóculo fue diluido al 50% y al 80% (v/v) en el tratamiento TCC y TCCF,

respectivamente. Así mismo, se destaca una diversidad de cianobacterias y de microalgas al final del estudio, con presencia de *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Lyngbya* sp., *Chroococcus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Navícula* sp. y *Nitzschia* sp. en el tratamiento TCC y con la presencia de estos mismos microorganismos en TCF, a excepción de la cianobacteria *Chroococcus* sp. Lo que permite inferir que tanto en el tratamiento TCC y TFC, donde fue inoculado el consorcio se identificaron las mismas taxa y con la presencia del consorcio al menos sus tres integrantes en TCC. De tal manera que, estos resultados sugieren una participación significativa del consorcio con su aporte de biomasa y de nutrientes al suelo.

En suelos inoculados con cianobacterias puede observarse la presencia de otros grupos de cianobacterias y microalgas. Por ejemplo, en un trabajo realizado con *Nostoc* sp. para evaluar su potencial como biofertilizante en suelos utilizados para el cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.), se aplicaron los tratamientos: Testigo; Inoculado (6 g ha<sup>-1</sup> de biomasa pura); Fertilizado (fosfato-diamónico 70 kg ha<sup>-1</sup>); Fertilizado e Inoculado. Entre los resultados obtenidos, se observó que en todas las muestras predominaron las diatomeas pennadas (*Bacillariophyta*), siendo el suelo inoculado, el único que presentó *Nostoc* y otras cianobacterias como grupo subdominante. Y entre las cianobacterias, *Lyngbya* fue el género más abundante y registrándose una pequeña proporción de *Microcoleus*. Mientras que, en las muestras Testigo, únicamente se observaron diatomeas pennadas y no se identificaron cianobacterias, ni Chlorophytas (Sotelo, Iglesias, & Punos, 2008). Estos resultados, coinciden con los obtenidos en el presente trabajo debido a que además, de la cianobacteria inoculada, pueden identificarse otros grupos de microalgas, pero tomando en cuenta que en muchos casos, en los suelos no inoculados, no se evidencia la presencia del consorcio o de cianobacterias que previamente han sido inoculadas.

En cuanto a la viabilidad de cianobacterias aisladas de rizósfera de plantas de arroz, se ha reportado un estudio en el que también se ha evaluado su persistencia en el suelo, en las raíces, y su capacidad para promover el crecimiento de plantas y mejorar la fertilidad del suelo en un cultivo de arroz cultivadas en macetas en condiciones de invernadero. En dicho estudio, de 20 cepas inoculadas, 15 de estas se mantuvieron viables en el suelo superficial hasta cosecha del cultivo. Mientras que, 9 mostraron un crecimiento visible en la rizósfera. Sin embargo, sólo 12 cepas persistieron en las raíces, y las otras muestras fueron

dominados por las cepas nativas *Nostoc* y cianobacterias del grupo LPP (Prasanna, Nain, Ancha, Jadhay, Joshi, & Kaushik, 2009). En otro estudio realizado para demostrar la persistencia de una cepa de *Nostoc* y su contribución a la fertilidad del suelo y al crecimiento de arroz, se encontró que después de tres semanas de la inoculación sobre 90% de la totalidad, se observaron las superficies de los suelos inoculados uniformemente cubierta con capas de *Nostoc* en combinación con otras cianobacterias. Mientras que, sólo parches delgados de cianobacterias se encuentra en la superficie de no inoculado suelos. Por lo que estas observaciones sugirieron que la cepa de *Nostoc* inoculada pudo estabilizarse y crecer en las superficies de los suelos experimentales (Maqubela, Mnkeni, Issa, Pardo, & D'Acqui, 2009).

Al respecto, es de indicar que la biomasa microalgal es fundamental para el mantenimiento de las funciones del suelo, ya que representa la principal fuente de las enzimas que regulan los procesos de transformación de elementos en los suelos. (Prasanna, Nain, Ancha, Jadhay, Joshi, & Kaushik, 2009).

De acuerdo al análisis físicoquímico realizado al suelo antes y después de ser inoculado con el consorcio y fertilizado con el producto comercial Nitrofoska, se encontró en cuanto al pH, que no hubo una variabilidad entre los tratamientos aplicados. Es decir, en presencia del consorcio (TCC), con el consorcio + fertilizante (TCF), testigo (TE), solo con el fertilizante y antes de los tratamientos, que el pH fue de 7,66; 7,21; 7,46; 7,03 y de 7,54, respectivamente. No obstante, estudios realizados por (Amal, Hegazi, Mostafa, Hamdino, & Ahmed, 2010), en cuanto a inoculación de cianobacterias en suelos encontraron que el pH del suelo y la conductividad presentó un ligero decrecimiento y quizás debido a que el uso de biofertilizantes nitrogenados con las cianobacterias puede causar una cierta acidificación de los suelos. Por lo que, la aplicación de consorcios con cianobacterias a suelos alcalinos puede resultar en una agregación de estos y a la vez una disminución del pH (Sutton, Barrett, & Taylor, 1991). Aunque, la proporción de agregados muy estables también se ha reportado cuando *Nostoc* ha sido inoculado y posiblemente debido a las mayores cantidades de carbono en el suelo y EPS observados en los suelos inoculados (Maqubela, Mnkeni, Issa, Pardo, & D'Acqui, 2009).

En cuanto al porcentaje de materia orgánica en los suelos se obtuvo un incremento de 3,63 veces en el suelo inoculado con el consorcio, en relación al suelo solo con el fertilizante químico. En cambio, en el suelo inoculado con el consorcio y el fertilizante (TFC) con respecto al tratamiento con el consorcio (TCC) el aumento de la materia orgánica fue de 2,01 veces. Estos resultados coinciden con los reportados por (Prasanna, Nain, Ancha, Jadhay, Joshi, & Kaushik, 2009), quienes luego de inocular 20 cepas de cianobacterias aisladas de rizósferas de diversas variedades de arroz y de trigo, tales como de *Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc* y *Hapalosiphon*, detectaron un aumento de la relación Carbono microbiano (Cmic) con respecto al Carbono orgánico (Corg); obteniéndose un rango entre 0.15 to 6.17; lo cual significó una elevada relación Cmic /Corg, como producto de la inoculación de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

En suelos salinos de Bangladesh e inoculados con 8 cepas de cianobacterias, previamente aisladas, identificadas y mantenidas en cultivos monoespecíficos, también se determinó un incremento en la materia orgánica, N total y P del suelo, con relación a los suelos no tratados con consorcios. De tal manera que estos pueden ser utilizados con eficacia para mejorar la fertilidad del suelo de suelo salino (Aziz & Hashem, 2003).

Las evaluaciones del nitrógeno presente en el suelo sometido a los diferentes tratamientos, evidencian que efectivamente la combinación del fertilizante químico con el consorcio de cianobacterias (TFC) aporta el mayor contenido de nitrógeno al suelo. Sin embargo, si se compara el contenido de nitrógeno entre el tratamiento TCC y el TFQ, se refleja un incremento de 3,33 veces cuando el suelo es inoculado con el consorcio.

El incremento del nitrógeno en suelos tratados con cianobacterias también ha sido reportado por otros autores. Entre los cuales se describe el trabajo de (Maqubela M. , 2009), quien detectó un aumento del N del suelo en un 40% y un 17% en dos tipos de suelos, respectivamente, y por lo tanto un aumento de materia seca del maíz en un 40 y 49%, cultivado en estos suelos e inoculado con la cepa *Nostoc* 9v. Por otra parte, la aplicación de cepas de *Nostoc*, *Anabaena oryzae*, *Wolleea* sp., *Phormidium* y de *Spirulina* en suelos cultivados con *Phaseolus vulgaris* mejoraron la disponibilidad de N, P y K de manera significativa; lo que les permitió proponer a (Amal, Hegazi, Mostafa, Hamdino, & Ahmed, 2010), que la ¼ parte o ½ del nitrógeno requerido en los fertilizantes comerciales, puede ser suministrado por las cianobacterias inoculadas.

El contenido de fósforo en cada uno de los tratamientos, no presentó diferencia significativa, lo cual sugiere que al menos no hubo una variabilidad evidente en cuanto al enriquecimiento con el P. Sin embargo, con el consorcio el suelo presentó un contenido de 42,67ppm. Mientras que, con el fertilizante fue de 37,07ppm. Al respecto, en suelos tratados con cianobacterias y cultivados con arroz en Bangladesh, tampoco detectaron variabilidad en el contenido de P del suelo después de la cosecha; aunque el mayor contenido de P de 19,1 ppm se registró en el tratamiento (RFD-40% N + cianobacterias), el cual correspondió a la dosis del fertilizante recomendada (RFD), con un 40% de nitrógeno y con la mezcla de cianobacterias. Mientras que el menor contenido de P, se observó en tratamiento control (Aziz & Hashem, 2003).

Con respecto al contenido de azufre en los suelos tratados con el consorcio, con el fertilizante, con la combinación (TCF), o en el testigo (TE) o antes del experimento (SAI), se obtuvo el mayor contenido de S en TCF, lo cual sugiere que el fertilizante comercial aplicado es rico en este elemento y a pesar de que en el tratamiento TCC se obtuvo un contenido de 73,17ppm, este contribuyó a incrementar el nivel de S en TCF con 109,79 ppm. Los resultados reportados por (Aziz & Hashem, 2003), indicaron para el azufre que su disponibilidad no fue significativamente afectada por la aplicación de las cianobacterias. Sin embargo, las parcelas tratadas con estas presentaron un mayor contenido de S, que aquellos que no fueron inoculados. Obteniéndose también para el tratamiento (RFD20% N + cianobacterias) el mayor contenido de S con 15,8 ppm y el más bajo en el control con 14,0 ppm.

Entre los cationes que presentaron cierta variabilidad en los suelos inoculados con el consorcio (TCC), los tratados con el fertilizante y el consorcio (TCF) y los tratados con el fertilizante químico, se distinguieron el Fe y Mn; puesto que el B, K, Ca, Mg, Cu y Zn no presentaron diferencias significativas entre estos tratamientos. El Fe se incrementó en el suelo TCC y TCF en 1,43 y 1,44 veces, respectivamente con respecto al fertilizado solamente con el producto químico. En cambio, el Mn, registró un aumento de 1,32 en relación al tratado con el fertilizante químico.

Respecto a estos resultados se ha reportado un estudio realizado en Arabia Saudita, con *Anabaena oryzae* y *Nostoc ellipsoidum*, e inoculadas por separado o en combinación con

suelo arenoso (2% P / P), con o sin bentonita (4% P/ P), antes del trasplante de las plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). En cuanto al contenido de cationes, encontraron que, aunque el Mn y Zn se incrementaron ligeramente, el Fe fue más elevado en aquellos suelos inoculados con la mezcla de cianobacterias en comparación con el suelo sin tratar (Al-Khiat, 2006).

La elevada diversidad y población de plántulas crecidas en los tratamientos TCC y TCF, con respecto al testigo, sugiere que la introducción del consorcio puede favorecer las condiciones estructurales y funcionales del suelo, para que sea estimulada la germinación de semillas de plantas silvestres. No obstante se apreció un ligero incremento en el suelo fertilizado con el consorcio de *Anabaena-Nostoc-Chlamydomonas*. En este sentido se prevee que la biomasa introducida, contribuya a incrementar la materia orgánica y de nutrientes para favorecer el crecimiento de estas plántulas. Tal es el caso de un estudio realizado con la inoculación de *Nostoc commune* en un campo de pastoreo de vacunos, en el cual se evaluó, la posible relación positiva entre la presencia de esta cianobacteria y la germinación de semillas y la emergencia de plántulas. Al respecto, se observó que los micrositios cubiertos por la cianobacteria mostraron un mayor número de plántulas en otoño, invierno y primavera, y que la mayor abundancia de plántulas (68.3 plántulas/dm<sup>2</sup>) ocurrió en las microdepresiones con *Nostoc*. De tal manera que los autores, concluyeron que la presencia de las biodermas de la cianobacteria tiene un significativo impacto ecológico, al mejorar las propiedades del suelo, estimulando la germinación, la emergencia y el establecimiento de las plantas anuales tales como *Hordeum pusillum*, que bajo la influencia de la cianobacteria el suelo fue menos alcalino y se incrementó su contenido de materia orgánica, carbono y nitrógeno (Ansín, Deregibus, & Lanfranco, 2012)

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que el uso de consorcios con cianobacterias fijadoras de nitrógeno constituyen una alternativa para mejorar las condiciones de los suelos en cuanto a nutrientes, materia orgánica y factibilidad de germinación de semillas; dada la viabilidad del consorcio bajo condiciones adecuadas de iluminación y de humedad.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

1. El mayor número y diversidad de cianobacterias y microalgas fue aislado de la rizósfera y raíces de la planta de *Vicia faba* (haba).
2. *Anabaena* sp. y *Chamydomonas* sp. resultaron los taxa con mayor adaptabilidad para mantenerse viables en el suelo, puesto que estuvieron presentes sobre el sustrato a lo largo de todo el ensayo. Además demostraron una relación biológica entre ellas.
3. La sucesión de especies tanto de microalgas como de cianobacterias en el suelo evidenciaron su posible relación con la disponibilidad de nutrientes, temperatura, microbiota asociada, iluminación y pH.
4. De los análisis químicos se observó que el mayor aporte de materia orgánica para el suelo fue provisto por el tratamiento de fertilizante químico adicionado al consorcio de cianobacterias con una media de 4.50 %; seguido por el tratamiento con consorcio de cianobacterias con 2.24% y del tratamiento con fertilizante químico con 0.61%.
5. El análisis de Nitrógeno reportó al tratamiento de la combinación de fertilizante químico con el consorcio de cianobacterias con el contenido más alto, con una media de 0.22%; seguido por el tratamiento con el consorcio de cianobacterias con 0.11% y del tratamiento con fertilizante químico con 0.03%.
6. La condiciones nutricionales del suelo, provistas por el aporte de nutrientes de los diferentes tratamientos permitió la aparición de plántulas silvestres, entre las que destacaron *Pennisetum clandestinum*, *Urtica urens* y *Trifolium repens*. El mayor número y diversidad de plantas sucedió en el tratamiento con el consorcio de cianobacterias con un valor promedio de 37, seguido del

fertilizante químico+ consorcio, con 35,7 y del tratamiento testigo con 26.7 plantas.

7. Se establece un protocolo para la producción y mantenimiento de consorcios con cianobacterias fijadoras de nitrógeno, medio de cultivo y condiciones de escalado de los cultivos discontinuos. La conformación de consorcios cianobacterias-microalgas en biotecnología agrícola permite ampliar el espectro de microorganismos utilizados en biofertilización de suelos.

## **CAPÍTULO VII**

### **RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios sobre la caracterización bioquímica y genética molecular con la finalidad de identificar taxonómicamente las especies de las cepas aisladas de *Nostoc* spp. y *Anabaena* spp.
2. Optimizar la producción de biomasa en cultivos semicontinuos en función de diversos parámetros ambientales.
3. Evaluar los efectos biofertilizantes de los consorcios de cianobacterias en cultivos con plantas leguminosas, a nivel de campo e invernadero.
4. Diseñar estrategias tecnológicas para inocular los consorcios de cianobacterias en suelos con cultivos extensivos y en suelos erosionados.

## **CAPÍTULO VIII**

### **BIBLIOGRAFÍA**

III Censo Nacional Agropecuario. (2000). *III Censo Nacional Agropecuario*.

Acosta, K., Santos, R., Silva, S., & Esparza, D. (1996). Evaluación cualitativa y cuantitativa de microalgas en la rizosfera del cultivo de frijol. *Revista de la Facultad de Agronomía* , Vol 13 (1): 13-24.

Aguirre, J., Irizar, M., Durán, A., Grajeda, O., Peña, M., Loredo, C., y otros. (2009). *Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México*. México: Centro de Investigación Regional Pacífico Sur Campo Experimental Rosario Izapa.

Alexander, M. (1982). Most probable number methods for microbial populations. *American Society of Agronomy Inc.* , 815-820.

Al-Khiat, A. (2006). *Effect of Cyanobacteria as a Soil Conditioner and Biofertilizer on Growth and Some Biochemical Characteristics of Tomato (Lycopersicon esculentum L.)*. Arabia Saudita: King Saud University. Tesis de Maestría.

Almon, H., & Boger, A. (1988). Nitrogen and Hydrogen metabolism Induction and measurement. *Enzymol* , 459-467.

Amal, Z., Hegazi, A., Mostafa, M., Hamdino, M., & Ahmed, I. (2010). Influence Of Different Cyanobacterial Application Methods On Growth And Seed Production Of Common Bean Under Various Levels Of Mineral Nitrogen Fertilization. *Nature and Science* , 8 (11): 183- 193.

Ansín, O., Deregibus, A., & Lanfranco, J. (2012). Papel del alga Nostoc commune y efecto del pastoreo por vacunos sobre la colonización de suelos alcalinos en la Pampa Deprimida. *Ecología Austral* , 12:135-142.

Armenta, A., García, C., Camacho, R., Apodaca, M., & Montoya, L. &. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable* , 51-54.

Armenta, A., García, C., Camacho, R., Apodaca, M., Montoya, L., & Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable* , 51-54.

Arora, M., Kaushik, A., Rani, N., & Kaushik, C. (2010). Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination. *Journal of Environmental Biology* , 31(5): 701-704.

- Aziz, M., & Hashem, M. (2003). Role of Cyanobacteria in Improving Fertility of Saline Soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences* , 6 (20) :1751- 1752.
- Balasubramaniam, R., Mallavarupu, M., Kaduyala, V., Ravi, N., & Nambrantil, S. (2010). The Impacts of Environmental Pollutants of Microalgae and Cyanobacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Volume 40 , 699-821.
- Barón, F., & Téllez, F. (2002). *Apuntes de Bioestadística*. D.F. México: Tinta Negra.
- Barrera, V., & Oyarzun, P. &. (2000). *Eco- suelos: Investigación para un manejo más productivo y sostenible de suelos andinos en la ecoregión Centro- Norte del Ecuador*. ECUADOR: CODESAN.
- Barrera, V., Oyarzun, P., & Sherwood, S. (2000). *Eco- suelos: Investigación para un manejo más productivo y sostenible de suelos andinos en la ecoregión Centro- Norte del Ecuador*. ECUADOR: CODESAN.
- Báscones, E. (2005). *Análisis de Suelos y Consejos de Abonado*. Valladolid: INEA.
- Becker, W. (2004). Handbook of microalgal culture. *Microalgae in human and animal nutrition* , 312-351.
- Bennet, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue- green alga. *Journal of Cell Biology* , 58: 419-435.
- Borowitzka, M., & Borowitzka, L. (1988). *Microalgal Biotechnology*. Reino Unido: Cambridge University.
- Carr, N., & Whitton, B. (1982). *The Biology of Cyanobacteria (2nd Edition)*. California: University of California at Berkeley Press.
- Castenholz, R. (1992). Species usage, concept and evolution in the cyanobacteria (blue green alfae). *Journal of Phycology* , 737-745.
- Cossoli, M., Iglesias, M., & Pérez, G. G. (2008). *La biofertilización, su interacción con la presencia de Rhizobium y micorrizas en el suelo*. Argentina: Comunicaciones científicas y tecnológicas.
- Cossoli, M., Iglesias, M., Pérez, G., & Gómez, C. (2008). *La biofertilización, su interacción con la presencia de Rhizobium y micorrizas en el suelo*. Argentina: Comunicaciones científicas y tecnológicas.
- De la Noüe, J., Blier, R., Laliberté, G., Lavoine, M., Lessard, P., McLaughlin, L., y otros. (1993). Use of Phormidium bohneri for the biotreatment of polluting effluents. *6th International Conference on Applied Algology*, (pág. 91). República Checa.
- De Philipps, R., & Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology* , 151-175.

- Díaz, L. (2011). *Estudio de tratabilidad de aguas petrolizada mediante uso de bacterias heterotróficas aeróbicas y microorganismos fotosintéticos*. Maracaibo: Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia.
- Diéz, J. (1999). Optimización de la fertilización nitrogenada: procedimientos de análisis de suelo, toma de muestra y elección del tipo de fertilizante. *Edafología* , 73-84.
- Domingo, P., & Romero, M. (2011). *La Cianobacteria- Caso Lago de Atitlán*. Guatemala: AMSCLAE.
- Doods, W., Gudder, D., & Mollenhauer, D. (1995). The ecology of Nostoc. *Phycology* , 2-18.
- Doods, W., Gudder, D., & Mollenhauer, D. (1995). The ecology of Nostoc. *Phycology* , 2-18.
- Ehling - Schulz, M., & Bilger, W. &. (1997). UV- B - Induced synthesis of photoprotective pigments and a extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium Nostoc commune. *Bacteriology* , 179 (6): 1940- 1945.
- Fay, P., & Van Baalen, C. (1987). *The Cyanobacteria* . Amsterdam: Elseiver.
- Gantar, M., & Svircev, Z. (2008). Foods for thought. *Microalgae and cyanobacteria* , 260-268.
- Gao, K., & Ye, C. (2003). Culture of the terrestrial cyanobacterium. Nostoc flagelliforme (cyanophyceae), under aquatic conditions. *Phycology* , 39: 617-623.
- Garbisu, C., Blanco, A., Llama, M., & Serra, J. (1999). Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y ciencia* , 64-71.
- Garbisu, C., Blanco, A., Llama, M., & Sierra, J. (1999). Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y ciencia* , 64-71.
- García, A., & Pichel, J. (2009). *Encyclopedia of Microbiology*. Estados Unidos: SCHAECHTER.
- Gaubeca, L. (2003). *Remoción de nutrientes de aguas residuales en las lagunas del sistema de estabilización del CIA-LUZ mediante el uso de la cianobacteria Synechocystis sp.* Maracaibo: Ciencias Ambientales, Universidad del Zulia.
- Glazer, A. (1994). Phycobiliproteins- a family of valuable, widely used flurophores. *Phycology* , 105-112.
- Gosh, T., & Saha, K. (1997). Effects of inoculation of cyanobacteria on nitrogen status and nutrition of rice (*Oriza sativa* L.) in an etisol amended witch chemical and organic sources of nitrogen. *Biology and Fertility of Soils* , 123-128.

- Guerrero , M., Moreno, J., Vargas , M., Olivares, H., & Rivas, J. (1998). Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Biotechnology* , 175-182.
- Herrero, A., & Flores, E. (2008). *Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Norfolk, Uk: Caister Academic Press.
- Holt, J., Krieg, P., Sneath , J., Staley, S., & Williams, T. (1993). *Manual of Determinative Bacteriology*. U.S.A: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jonte, L. (2003). *Crecimiento de la Cianobacteria Synechocistis minuscula en respuesta a diversos parámetros de cultivos*. Maracaibo: Biología, Universidad del Zulia.
- Kannaiyan, S. (2002). Biofertilizers for sustainable crop production. *Biotechnology of Biofertilizers* , 9-39.
- Kaushik, B., & Venkatamaran, G. (1979). Effect of algal inoculation on the yield and vitamin C content of two varieties of tomato. *Plant and Soil* , 135-137.
- Komarék, J., & Anagnostidis, K. (1999). *Cyanoprokaryota:1* . Alemania: Gustav Fisher.
- Komarék, J., & Hauer, T. (22 de Octubre de 2008). *CyanoDBcz: a database of cyanobacterial genera*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2013, de CyanoDBcz: a database of cyanobacterial genera: [http://www.cyanodb.cz/valid\\_genera](http://www.cyanodb.cz/valid_genera)
- Lee, C., & Palsson, B. (1994). High- density algal photobioreactors using light-emitting diodes. *Biotechnology and Bioengineering* , 1161-1167.
- Lee, E. (1999). *Phycology (3rd Edition)*. Estados Unidos: Cambridge University Press.
- Lem, N., & Glick, B. (1985). Biotechnological uses of cyanobacteria. *Biotechnological Advances* , 195-208.
- León, C., & Rojas, J. (1996). Utilización de cianobacterias (algas verde-azules) fijadoras de nitrógeno y el helecho acuático Azolla, como biofertilizantes en el cultivo de arroz anegado. *X Congreso Nacional Agronómico/II Congreso del Suelo* (pág. 1). Costa Rica: Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional.
- Li, R., & Watanabe, M. (1997). Akinete formation in planktonic *Anabaena*. *Phycology* , 576-584.
- Lin, C.-S., Chou, T. L., & Wu, J. T. (2013). Biodiversity of soil algae in the farmlands of mid-Taiwan. *Botanical Studies* , 54: 41-53.
- Mann, N., & Carr, N. (1992). *Photosynthetic Prokaryotes*. New York: Plenum Press.

- Maqubela, M. (2009). *Bioconditioning and nitrogen fertility effects of selected cyanobacteria strains on two degraded soils in the Eastern Cape*. Sudáfrica: Faculty of Science & Agriculture. University of Fort Hare.
- Maqubela, M., Mnkeni, P., Issa, O., Pardo, M., & D'Acqui, L. (2009). Nostoc cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. *Plant & Soil* , 315 (12): 79-92.
- Masabni, J. G., & Lillard, P. (2011). Jardinería Fácil Fertilización. *AgriLIFE EXTENSION* , 4.
- Masojidek, J., Koblizek, G., & Torzillo, G. (2004). Photosynthesis in Microalgae . *Biotechnology and applied phycology* , 91-97.
- Metting, B. (1994). Methods of Soil Analysis. *Microbiological and Biochemical Properties* , 5.
- Mian, P., Heilmann, J., Bürgi, H., & Sticher, O. (2004). Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine, shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biotechnology* , 243-247.
- Mishra, A., & Kumar, S. (2007). Cyanobacterial biomass as N- supplement to agro-waste for hyperproduction of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Prokaryote Biochemical* , 681-687.
- Monteros, S., & Iglesias, R. (2005). *Inoculación de cianobacterias en el cultivo de soja, efectos sobre la infectividad de Bradyrhizobium japonicum y la producción de materia seca*. Argentina: Comunicaciones científicas y tecnológicas.
- Morales Avendaño, E. (2 de Julio de 2013). Fuente Hablada de Información. (R. Martínez, Entrevistador)
- Morales Avendaño, E. (2011). *Manual de Laboratorio de Ficología*. Quito: PUCE.
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & 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* , XXXIV )1,2 : 129-149.
- Noni, G., & Trujillo, G. (1986). *La erosión en el Ecuador*. Ecuador: Consejo de Redacción de DOCUMENTOS DE INVESTIGACION.
- Oren, A. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria*. Países Bajos: Kluwer Academic Publishers.
- Prasanna, R., & Nayak, S. (2007). Influence of diverse rice soil ecologies on cyanobacterial diversity and abundance. *Wetlands Ecol Manage* , 127-134.

- Prasanna, R., Nain, L., Ancha, R., Jadhay, S., Joshi, M., & Kaushik, B. (2009). Rhizosphere dynamics of inoculated cyanobacteria and their growth-promoting role in rice crop. *Egyptian Journal of Biology* , (11): 26-36.
- Raps , S., Kycia, H., Ledbetter, M., & Siegelman, H. (1985). Light intensity adaptation and phycobilisome composition of *Microcystis aeruginosa*. *Plant Physiology* , 983-987.
- Red BIOFAG. (21 de Julio de 2007). *Red Iberoamericana de Fertilizantes Biológicos de la Agricultura y el Medio Ambiente*. Obtenido de [www.biofag.org.ar](http://www.biofag.org.ar)
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., & Stainer, R. (1979). *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. J. Gen. Microbiology.
- Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramírez, D., & Rimbau, V. (2003). Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Proteins and Peptids* , 207-216.
- Salaru, V., Trofim, A., Melniciuc, C., & Donu, N. (2008). Taxonomic and ecologic structure of communities of edaphic algae from the agrophytocenoses of the northern districts of Moldova. *Plant Develop* , 15: 3-6.
- Sánchez, C., Benintende, S., & Benintende, M. (2011). Cianobacterias en diferentes estadios fenológicos del cultivo de arroz en Entre Ríos (Argentina). *Ciencia del Suelo* , 181-189.
- Sánchez, J. (2003). *Fertilidad del suelo y nutrición mineral de las plantas* . México: FERTITEC.
- Sanjuán, J. (18 de Abril de 2010). *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial* . Recuperado el 27 de Enero de 2013, de Producción de biofertilizantes: [www.unal.edu.co/documentos/seminarioCABBIO\\_20060531.pdf](http://www.unal.edu.co/documentos/seminarioCABBIO_20060531.pdf).
- Schagerl , M., & Müller, B. (2006). Acclimation of chlorophyll and acarotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *Plant Physiology* , 709-716.
- Sekar, S., & Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Phycology Applications* , 113-136.
- Sinoven, K., Carmichael, W., & Namikoshi, M. &. (1990). Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous fresh- water cyanobacterium *Nostoc* strain- 152. *Micribiology* , 56: 2650-2657.
- Sotelo, C., Iglesias , M., & Punos, L. (2008). *Efecto de la coinoculación cianobacterias - *Bradryrhizobium japonicum* sobre la actividad biológica del suelo*. Argentina: Comunicaciones científicas y tecnológicas.

- Spolaore, P., Joannis- Cassan, C., Durán, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Bioengin* , 87-89.
- Stainer, R., & Cohen- Bazire, G. (1977). Phototropic prokaryotes: the cyanobacteria. *Microbiology* , 225-274.
- Stainer, R., Ingraham, J., Wheels, M., & Painter, P. (2005). *MICROBIOLOGÍA Segunda Edición*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Streble, H., Krauter, D., & Rieradevall Sant, M. (1987). *Atlas de los microorganismos de agua dulce*. EEUU: Omega.
- Suquilanda, M. (2008). El deterioro de los suelos en Ecuador y la producción Agrícola. *XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo* (págs. 1-56). Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Sutton, S., Barrett, G., & Taylor, D. (1991). Microbial metabolic activities in soils of old-field communities following eleven years of nutrient enrichment. *Environmental Pollution* , 73: 1-10.
- Teneva, I., Stoyanov, P., Mladenov, R., & Dzhambazov, B. (2012). Molecular and phylogenetic characterization of two species of the genus *Nostoc* (Cyanobacteria) based on the *cpcB-IGS-cpcA* locus of the phycocyanin operon. *J. BioSci.Biotech* , 9-19.
- Terry, A., & Leyva, Á. &. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología* , 47-54.
- Terry, A., Leyva, Á., & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología* , 47-54.
- Thayumanayan, B., & Paryathy, K. (2002). Biochemistry of nitrogen fixation and assimilation. *Biotechnology of Biofertilizers* , 74-82.
- UNAD. (10 de marzo de 2012). *Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería*. Obtenido de [http://www.unad.edu.co/fac\\_ingenieria/pages/Microbiologia\\_mutimedia/cianobacterias.htm](http://www.unad.edu.co/fac_ingenieria/pages/Microbiologia_mutimedia/cianobacterias.htm)
- Ventakataran, G. (1981). *Blue- green algae for rice production*. FAO.
- Vincent, W. (2009). *Encyclopedia of Inland Waters*. Amsterdam: Elseiver.
- Whitton, B. (1992). *Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria*. EEUU: Plenum Press.
- Whitton, B., & Potts, M. (2000). *Introduction to the cyanobacteria*. Estados Unidos: Kluwer Academic Publishers.

