

# Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos

Ever Morales<sup>1</sup>, Verónica Luna<sup>2</sup>, Lucía Navarro<sup>2</sup>, Vismeli Santana<sup>2</sup>, Ana Gordillo<sup>2</sup> y  
Andrés Arévalo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Proyecto PROMETEO-SENESCYT.

<sup>2</sup>Escuela de Bioanálisis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

<sup>3</sup>Unidad de Biología, Centro de Ciencias, Universidad Central del Ecuador

evermster@gmail.com

Recibido: 24, 06, 2013; aceptado: 17, 09, 2013

**RESUMEN.-** El presente trabajo conforma un estudio sobre diversidad, identificación y aislamiento de microalgas y cianobacterias a partir de muestras de aguas continentales, termales, salobres y lodos; colectadas en 74 sitios de 25 sectores de las provincias del Carchi, Guayas, Imbabura, Pichincha y Santa Elena (Ecuador), entre octubre 2011 y abril 2012, con la finalidad de poder determinar en dichas muestras, su diversidad inicial, sucesión de estos microorganismos y la estabilidad de los consorcios entre microalgas y cianobacterias durante la fase de selección de muestras y de aislamiento para el establecimiento de una colección *in vitro* de cultivos de microorganismos fotosintéticos para la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. De 194 muestras evaluadas, fueron aislados el 43.81 % de microalgas y cianobacterias; donde los taxones más susceptibles de ser aislados son: *Chlorella*, *Desmodesmus* y *Leptolyngbya*. En cambio, se mantuvo el 56.19 % como consorcios o cultivos mixtos de microalgas y cianobacterias. De estos, se cuantificaron 14 cultivos solo con cianobacterias; 40 solo entre microalgas y 55 mixtos (31 y 18, taxa de microalgas y cianobacterias; respectivamente). Los taxa más frecuentes en los consorcios microalga-microalga fueron: *Chlorella* sp.>*Desmodesmus* sp. >*Navicula* sp.; en los cianobacteria-cianobacteria: *Leptolyngbya* sp.> *Calothrix* sp.> *Nostoc* sp. y en los microalga-cianobacteria: *Leptolyngbya* sp.>*Navicula* sp.> *Chlorella* sp.> *Desmodesmus* sp.> *Calothrix* sp. Las muestras obtenidas en la laguna “El Salado”, San Gabriel, Carchi presentaron la mayor diversidad. Mientras que, las colectadas en “Aguas Hediondas”, Tufiño, Carchi mostraron exclusividad de *Dictyosphaerium* sp., *Microspora* sp., y *Mougeotia* sp. La cianobacteria *Leptolyngbya* sp., refleja ser altamente competitiva en cultivos envejecidos y deficientes en nutrientes. Se recomienda ingresar todos los consorcios a las colecciones, dada su importancia como fuentes de biodiversidad y para estudios de fisiología, biotecnología ambiental y agrícola.

**PALABRAS CLAVES:** cianobacteria, colección de cultivos, consorcio, Ecuador, microalga

**ABSTRACT.-** We conducted a study on diversity, identification and isolation of microalgae and cyanobacteria from inland waters, springs, brackish water and slurries collected at 74 sites in five province: Carchi, Guayas, Imbabura, Pichincha and Santa Elena (Ecuador), between October 2011 and April 2012. The samples were characterized by initial diversity, succession of these microorganisms, and the stability of microalgae and cyanobacteria consortia during the sample selection and isolation process. These isolates were used for the establishment of a collection of *in vitro* cultures of photosynthetic microorganisms for the School of Bioanalysis of the Pontificia Universidad Católica del Ecuador. From the 194 samples tested, 43.81 % of the isolates were single species of microalgae and cyanobacteria. The taxa more likely to be isolated were the genera, *Chlorella*, *Scenedesmus* and *Leptolyngbya*. In contrast, 56.19 % of the isolates remained as consortia or mixed cultures of microalgae and cyanobacteria. Of these, 14 cultures were only cyanobacteria, 40 were microalgae and 55 were mixed cultures (31 and 18 taxa of microalgae and cyanobacteria, respectively). The most common genera of microalgae in the microalgae consortia were, *Chlorella* sp. > *Scenedesmus* sp. > *Navicula* sp. The most common genera in the cyanobacteria consortia were *Leptolyngbya* sp. > *Calothrix* sp. > *Nostoc* sp. The most common genera in the microalgae-cyanobacteria consortia were *Leptolyngbya* sp. > *Navicula* sp. > *Chlorella* sp. > *Scenedesmus* sp. > *Calothrix* sp. The samples from Laguna “El Salado”, San Gabriel, Carchi had the highest diversity. While, those collected in Aguas Hediondas Tufiño, Carchi contained only *Dictyosphaerium* sp., *Microspora* sp. and *Mougeotia* sp. The cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. was highly competitive and characterized aged cultures and nutrient deficiencies. It is recommended that all consortia be entered into culture collections because of their importance as sources of biodiversity. These consortia can also be important in physiological, ecology and environmental studies and development of techniques for agricultural biotechnology.

**KEYWORDS:** cyanobacteria, consortium, culture collection, Ecuador, microalgae

## INTRODUCCIÓN

La importancia que presentan los microorganismos fotosintéticos como productores primarios, fuentes de compuestos de interés económico, agentes depuradores de aguas residuales, de suelos contaminados, complemento alimenticio, o como bioindicadores de calidad de aguas, conlleva a establecer estrategias de su conservación *ex situ* (Lascuráin *et al.*, 2009), mediante la creación de colecciones *in*

*vivo*. Estas, constituyen recursos genéticos para estudios de biodiversidad y de biotecnología (Friedl y Lorenz, 2012; GBIF, 2009; Ortega, 2009). Así como para estudios integrados de bioprospección (Castree, 2003), relacionados con aislamiento, identificación y cultivo, especialmente de microorganismos procedentes de ambientes extremófilos, subtropicales, tropicales, marinos y de otros ambientes. Tales estudios representarían una base

para la investigación de sus características morfológicas, moleculares, metabólicas y su posible utilización para los diversos fines indicados. Al respecto, el Banco Español de Algas (BEA), con sede en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria de España, contempla permanentemente estudios sobre aislamiento, conservación y evaluación de cepas para su aplicación en biotecnología relacionadas con iniciativas científicas e industriales para la producción de biocombustibles y captación de CO<sub>2</sub> (García, 2011; Banco Español de Algas, 2008).

Estos lineamientos reflejan la necesidad de creación de las colecciones vivas de microalgas y cianobacterias, para investigación básica en taxonomía, ecología, genética, estructura y biogeografía (Mora, 2010; Delgadillo *et al.*, 2009; López-Adrián y Barrientos-Medina, 2005). A través de una colección se podrá ofrecer una amplia colección de microalgas y cianobacterias que permita la selección de cepas como fuente de biocombustible, de compuestos con actividad biológica, para acuicultura, biofertilizantes, etc.

Entre otros aspectos, los bancos de germoplasma, destinados al mantenimiento de cepas aisladas de ambientes naturales permiten tener accesibles líneas genéticas particulares de especies o grupos taxonómicos de interés para su estudio, comercialización o reintroducción a la naturaleza en forma de poblaciones vivas (Fernández-Concha *et al.*, 2004; Buitrago *et al.*, 1999). No obstante, para la preservación

del germoplasma estos microorganismos fotosintéticos como para todas las colecciones de heterótrofos, se requiere la gran labor del curador que asegure la reserva genética de estos organismos y cuyas técnicas van desde un crecimiento continuo hasta la aplicación de estrategias que reducen la velocidad del metabolismo mediante métodos de criopreservación o secado por congelamiento (Fernández-Concha *et al.*, 2004).

En cuanto a las actividades iniciales para la creación o adición de cepas a una colección, es indispensable el conocimiento y entrenamiento de las técnicas de colección de muestras, que permitan la preservación y adecuada manipulación de las mismas, para su posterior análisis y determinación taxonómica (Montes de Oca *et al.*, 2008; Stein, 1973). Posteriormente, se pasa a la fase de aislamiento mediante el uso de diversos medios de cultivo según sea la procedencia y tipo de microalga y cianobacteria. Normalmente las instituciones o laboratorios de investigación conservan colecciones acreditadas de cultivos, desde donde se pueden obtener las cepas unialgales y en medios selectivos o genéricos para las especies marinas o dulceacuícolas.

Entre las colecciones más importantes a nivel mundial, se reporta la colección de la Universidad de Texas de Estados Unidos (Starr, 2010); en Australia se cuenta con la Colección Nacional de cultivos de algas de Australia (ANACC-CSIRO). Mientras que, en Portugal se destaca la Algoteca de la Universidad de Coimbra (Santos,

2008) y en Francia se mantiene el cepario de cianobacterias del Instituto Pasteur (Billard, 1987). En relación con Latinoamérica, se tiene la colección de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste de México (Arredondo, 1997); en Argentina la de la Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco" (Albarracín *et al.*, 2009) y en Chile la colección de microalgas de la Universidad de Concepción (González *et al.*, 2008).

Se resalta en el presente trabajo la investigación realizada en el laboratorio de Ficología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Se la inició con la colecta de muestras en diferentes sectores geográficos del Ecuador, identificación de cepas y elaboración de un registro de las mismas, mediante una base de datos, así como también, la selección de áreas geográficas para bioprospección de microalgas y cianobacterias de interés en biotecnología ambiental, biomedicina y agroalimentación.

En relación con estudio de monitoreo de muestras colectadas en los diferentes ambientes seleccionados para su posterior aislamiento, no se tienen reportes, ni información en artículos científicos sobre colecciones de microalgas y cianobacterias existentes en el Ecuador. Tampoco, se han descrito reportes sobre los diferentes taxa

presentes en una muestra original y como las condiciones de laboratorio pueden modular su población y permanencia durante el proceso de aislamiento. Aun cuando el curador debe tratar de aislar el mayor número posible de especies, en función de los medios de cultivos utilizados, condiciones de temperatura, nutrientes e iluminación.

Por ello, el presente trabajo pretende demostrar la importancia de registrar la biodiversidad de microalgas y de cianobacterias procedentes de distintos ambientes geográficos del Ecuador, así como, la necesidad de reportar la existencia de los taxa observados, y las microalgas y cianobacterias susceptibles de ser conservadas en consorcios nativos procedentes de los sitios de colecta. Además, se hace referencia a la importancia de promover las colecciones de microalgas como línea base para investigación básica y aplicada a biotecnología, ecofisiología y taxonomía en el Ecuador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitios de muestreos.-** Se realizaron muestreos de campo en las provincias del Carchi, Guayas, Imbabura, Pichincha y Santa Elena (Ecuador). La Tabla 1 señala las localidades y el número de muestras colectadas por estaciones.

**Tabla 1**  
 Sitios de muestreo (provincias Santa Elena, Guayas, Carchi e Imbabura, Ecuador)

PROVINCIA	Localidad
CARCHI	Estación 1: Carretera asfaltada vía San Gabriel, después de la Gruta de la Paz (3) Estación 2: Gruta de la Virgen, Balneario (3) Estación 3: Laguna El Salado, San Gabriel (2) Estación 4: Termas Aguas Hediondas (3) Estación 5: Termas-Placa Proyecto Geotérmico (3)
GUAYAS	Estación 1: Parque del Lago (1) Estación 2: Bosque de Manglar, Puerto Hondo (1) Estación 3: Recinto San Gabriel, Vía Daule (2) Estación 4: Recinto Correntoso (2)
IMBABURA	Estación 1: Dique, San Antonio de Ibarra (2) Estación 2: Lago San Pablo (5) Estación 3: Laguna Yahuarcocha (3) Estación 4: Mojanda (2) Estación 5: Termas de Chachimbiro (3)
PICHINCHA	Estación 1: Parque Metropolitano (2) Estación 2: Jardín Botánico (11) Estación 3: Amaguaña (2) Estación 4: Parque Cayambe-Coca, Papallacta (6) Estación 5: Parque La Moya (1)
SANTA ELENA	Estación 1: Baños termales de San Vicente (5) Estación 2: CENAIN (piscina de cultivo con tilapia) (2) Estación 3: Comuna El Azúcar, Zapotal (2) Estación 4: La Chocolatera, Salinas (3) Estación 5: Piscinas de sal de Monteverde (2)

Entre paréntesis se indica el número de sitios muestreados en cada sector.

**Toma de muestra.-** Las muestras fueron colectadas en frascos de vidrio, envases plásticos y en bolsas de polietileno etiquetados a partir de aguas, lodos, sedimentos y de superficie de rocas. Para la colecta de fitoplancton en la laguna de Yahuarcocha y en el lago San Pablo, Imbabura (Ecuador), se utilizó una red de fitoplancton de 22  $\mu\text{m}$ . Las muestras de lodos y sedimentos fueron colectadas manualmente con envases de plástico para muestras biológicas y con espátula. Las comunidades de microalgas crecidas sobre

rocas y piedras fueron colectadas mediante raspados con cepillo en bolsas de polietileno o envases plásticos y luego transportadas hasta el laboratorio. Cada una de las muestras en los diferentes sitios fueron extraídas por duplicado (Serrano *et al.*, 2004).

**Trabajo de laboratorio.-** Para cada muestra se consignaron los caracteres del hábitat, localidad, fecha, número del colector y pH (Vergara, 2009; González *et al.*, 1995). A las muestras colectadas en zonas marinas se les determinó la salinidad

mediante el uso de un refractómetro. A partir de cada muestra original, se tomaron tres submuestras para su observación microscópica e identificación taxonómica. Para Cyanoprokaryota se utilizó la clave de Anagnostidis y Komárek (1988) y de Komárek y Anagnostidis (1989, 2005); para Chlorophyta la de Bourrelly (1981) y Eaton *et al.*, 1995 y las de Bacillariophyceae según Krammer y Lange-Bertalo (1991) y Rumrich *et al.* 2000.

**Siembra de muestras en medios de cultivos líquidos y sólidos.**- Las muestras de fitoplancton fueron resuspendidas en los medios de cultivo F/2 y fertilizante comercial Nitrofoska cuando las muestras estaban muy enriquecidas con diatomeas. En cambio, se utilizaron medio de cultivo BG11 completo y BG11<sub>v</sub> sin nitrógeno para las muestras con una población significativa de cianobacterias sin heterocitos o con heterocitos, respectivamente (Serrano *et al.*, 2004).

Para el caso de las muestras marinas o de aguas termales salobres se utilizaron los medios BG11, F/2 y fertilizante foliar Nitrofoska con ClNa al 3.5 %. Luego, las muestras eran transferidas tanto a medios líquidos no aireados, como a medios sólidos para dar inicio al aislamiento tanto de microalgas como de cianobacterias. Los cultivos en medio líquido BG11 completo, BG11<sub>0</sub>, Nitrofoska se mantuvieron en volúmenes de 10 ml en tubos de ensayos no herméticamente tapados. Todos fueron colocados bajo iluminación artificial continua y con lámparas fluorescentes a

una irradiancia de 78  $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  en condiciones de laboratorio.

Cada 15 días fueron monitoreados en cultivos, los cambios en cuanto a la población y existencia de taxa. Esto se realizaba sobre todo con los tubos de ensayo en donde aún permanecían los consorcios o mezclas tanto de microalgas como de cianobacterias. La densidad de población se determinó por observación al microscopio por recuento en cámara de Neubauer. Las muestras colonizadas por micelio o aquellas que por efecto del medio de cultivo y/o de las condiciones del laboratorio perdían viabilidad, fueron descartadas.

## RESULTADOS

A partir de las observaciones realizadas a las muestras colectadas se reportan las microalgas y cianobacterias que permanecen asociadas en consorcios y las aisladas en los diferentes medios de cultivos; como también las que se mantienen en las muestras originales. Este reporte, permitió establecer la estabilidad de las poblaciones existentes en los microambientes estudiados con las cuales han sido inoculadas en los medios de cultivos.

Las localidades con mayor riqueza específica de microalgas fueron la Comuna "El Azúcar", Zapotal, "Parque La Moya", "Recinto Correntoso", Vía Daule, "Amaguaña", laguna "Yahuarcocha" y lago "San Pablo"; siendo la laguna "El Salado", San Gabriel, Carchi la más representativa con 14 taxa, de los cuales 13 corresponden a las diatomeas: *Gomphonema* sp., *Navicula*

sp, *Nitzschia closterium* y *Synedra* sp.; a las clorofitas: *Spirogyra* sp., *Staurastrum* sp., *Lagerheimia citrififormis*, *Kirchneriella* sp., *Tetraedron* sp., *Oedogonium* sp., *Desmodesmus* sp., y una no identificada en estado palmeloide y a las cianobacterias: *Oscillatoria* sp. y *Microcystis* sp. (Tabla 2a). Al término de dos meses en condiciones de

laboratorio, la riqueza específica se redujo a *Navicula* sp., y *Gomphonema* sp., pero con la adición de *Pseudanabaena* sp. y *Leptolyngbya* sp.; lo cual deduce que las clorofitas parecen ser susceptibles a cambios ambientales en condiciones de laboratorio, ya que ninguna fue observada en las evaluaciones realizadas con posterioridad.

**Tabla 2a**

Registro de microalgas y cianobacterias (abundancia y observaciones) en muestras colectadas en varios sitios sectores de la provincia del Carchi

Procedencia muestra	Microalga/cianobacteria	Abundancia	Observaciones
1/Gruta de la Paz	<i>Navicula</i> sp.	++++	Raspado de rocas. Medio F/2
	<i>Chlorella</i> sp.	+	
2a/Gruta de la Paz	<i>Navicula</i> sp.	+++	Raspado de rocas. Medio F/2
	<i>Leptolyngbya</i> sp.	+	
2b/Gruta de la Paz	<i>Diatoma</i> sp.		Poca presencia de microalgas.
3/Gruta de la Paz. camino hacia las piscinas	<i>Anabaena</i> sp.	+++++++	Numerosos acinetos. Siembra en medios BG11 y F/2.
	<i>Diatomea pennada</i>	++	
	<i>Navicula</i> sp.	+	
4/Gruta de la Paz. Camino hacia las piscinas, caída de agua. Suelo con briofitas	<i>Anabaena</i> sp.	+++++	Medio BG11
	<i>Navicula</i> sp.	+	
5/Gruta de la Paz. Orilla del río.	<i>Phormidium</i> sp.	+++++	Siembra en medio sólido BG11.
	<i>Oscillatoria</i> sp.	++	
	<i>Lyngbya</i> sp.	+	
6/ Carretera asfaltada hacia San Gabriel-Km 3, después de la Gruta de la Virgen.	<i>Closterium</i> sp.	+++	Agua estancada cubierta por <i>Azolla</i> . Siembra en BG11. Presencia de <i>Closterium</i> sp. con cygospora.
	<i>Navicula</i> sp. 1	+++	
	<i>Navicula</i> sp. 2	+	
	<i>Anabaena azollae</i>	+	
	<i>Cosmarium</i> sp.	+	
7/Laguna El Salado-San Gabriel-Muelle	<i>Pandorina</i> sp.	+	Predominio de <i>Spirogyra</i> sp. Muestra con mayor diversidad de microalgas. Siembra en medio sólido y líquido con fertilizante Nitrofoska.
	<i>Spirogyra</i> sp.	+++++++	
	<i>Gomphonema</i> sp.	+++++++	
	<i>Navicula</i> sp.	++	
	<i>Nitzschia closterium</i>	+++	
	<i>Staurastrum</i> sp.	+	
	<i>Lagerheimia citrififormis</i>	++	
	<i>Kirchneriella</i> sp.	++	
	<i>Tetraedron</i> sp.	+	
	<i>Oedogonium</i> sp.	+	
	<i>Desmodesmus</i> sp.	+	
	<i>Oscillatoria</i> sp.	+	
	<i>Microcystis</i> sp.	+	
<i>Synedra</i> sp.	+		
8/charca orilla carretera frente a la laguna El	<i>Spirogyra</i> sp.	+++++	Siembra en medio líquido NF y en medio sólido BG11. Adición de extracto de levadura.
	<i>Anabaena</i> sp.	+++	
	<i>Navicula</i> sp.	++	

La Tabla 2b presenta los microorganismos hallados a partir de las muestras colectadas del balneario de “Aguas Hediondas”, Tufiño. En una de ellas, solo se observó un crecimiento exclusivo de *Ulothrix* sp., y mientras que en otra muestra del sector sorprende la presencia casi exclusiva de la

microalga colonial *Dictyosphaerium* sp., y acompañada de una menor población de *Anabaena* sp., y *Cosmarium* sp.. En relación con la presencia de *Dictyosphaerium* sp., poco frecuente en muestras, se caracterizó por mantener su predominio durante cuatro meses en la muestra original.

**Tabla 2b**

Registro de microalgas y cianobacterias (abundancia y observaciones) en muestras colectadas en varios sitios del Balneario de Aguas Hediondas, Tufiño, Carchi

Muestra/ Procedencia	Microalga/ cianobacteria	Abundancia	Observaciones
9a/Balneario de Aguas Hediondas	Crecimiento exclusivo de <i>Ulothrix</i> sp.	+++++++	Riachuelo del balneario de Agua Hediondas
9b/Balneario de Aguas Hediondas-piscina	Diatomeas pennadas. Filamento uniseriado	+++++++ ++	Raspado de piedra. Diversidad de diatomeas. Medio F/2
9c/Balneario de Aguas Hediondas	<i>Dictyosphaerium</i> sp. <i>Anabaena</i> sp. <i>Cosmarium</i> sp.	+++++++ +++ +	Medio NF
9d/Balneario de Aguas Hediondas, Placa Proyecto Geotérmico.	Clorofitas esféricas en pares en matriz mucilaginosas. <i>Oocystis</i> sp. <i>Cosmarium</i> sp. <i>Navícula</i> sp. <i>Microspora</i> sp. <i>Nostoc</i> sp.	+++++++ + ++ + ++++ + +	Muestra con briofitas. Medio sólido BG11 y medio líquido NF.
10a/Balneario de Aguas Hediondas, Placa Proyecto Geotérmico.	<i>Mougeotia</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Oocystis</i> sp. <i>Zygnema</i> sp.	++++ + + +	Medio líquido NF.
10b/Balneario de Aguas Hediondas, Placa Proyecto Geotérmico.	<i>Closterium</i> sp. <i>Zygnema</i> sp.	Predominante ++	Sedimento Medio líquido y sólido NF.

Abundancia: recuento estimado de microorganismos, unicelulares, coloniales o filamentos por campo de observación al microscopio. Medio NF: fertilizante comercial NITROFOSKA. Valoración de abundancia: escasa (+), moderada (desde ++ hasta +++++), abundante (desde ++++++hasta ++++++++).



De un total de 194 muestras evaluadas, se aisló el 42.27 %, de las cuales 23 corresponden a cianobacterias y 68 a las microalgas; encontrándose por orden de abundancia *Chlorella* sp. > *Desmodesmus* sp. > *Leptolyngbya* sp. > *Chroococcus* sp., con un 32 %, 13 %, 13 % y 8 %, respectivamente (Figura 1).

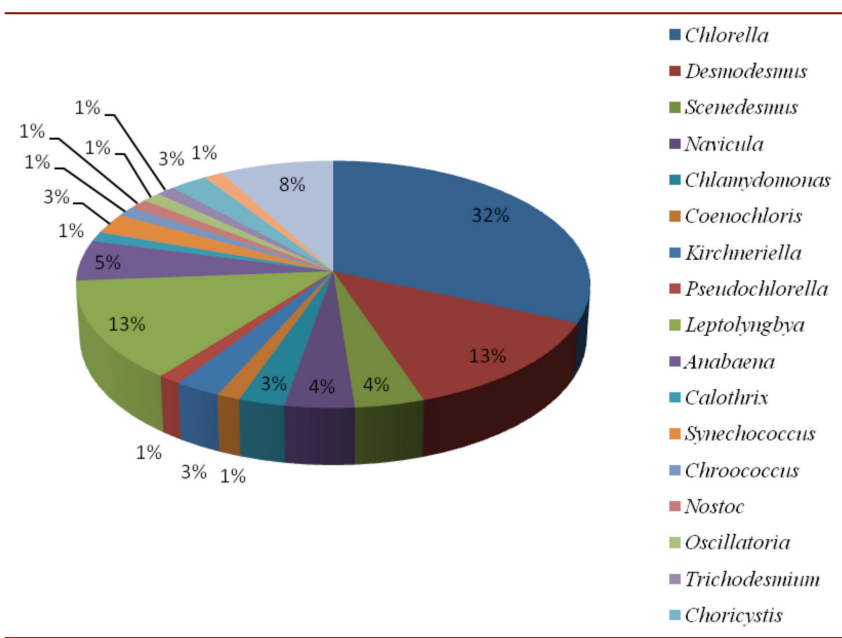


Figura 1. Porcentaje (%) de los principales taxa de microalgas y de cianobacterias aisladas.

En cambio, los consorcios alcanzaron 53 consorcios microalga-cianobacteria, con el 57.73 %, identificándose 40 muestras con 31 y 19 taxa de microalga y cianobacteria, consorcios microalga-microalga (37 taxa); respectivamente (Figura 2). 12 cianobacteria-cianobacteria (6 taxa) y

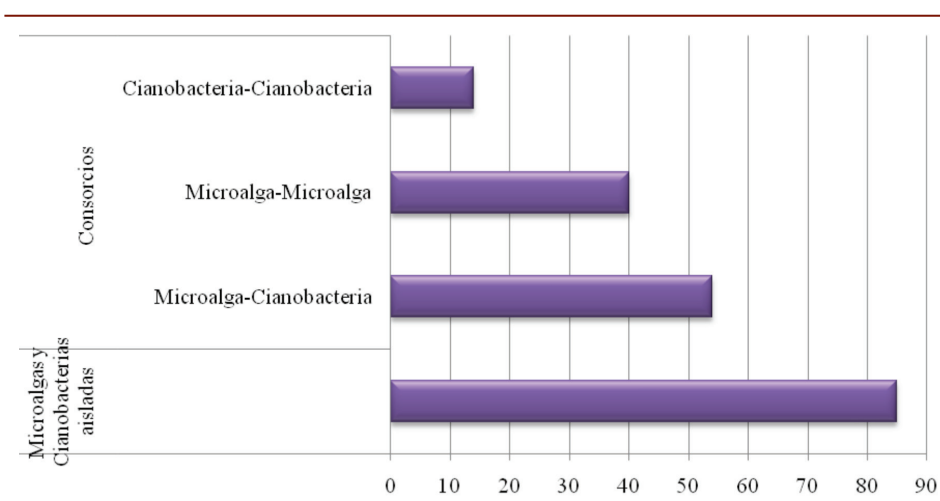


Figura 2. Número de muestras en consorcios: microalga-microalga, microalga-cianobacteria y cianobacteria-cianobacteria y de géneros de microalgas y de cianobacterias aisladas.

De acuerdo con el número de taxa en los consorcios, las clorofitas fueron las más abundantes, seguido de las cianobacterias, diatomeas y por último las euglenofitas, con 49.0 %; 30.0 %, 17.5 % y 3.2 %, respectivamente (Figura 3).

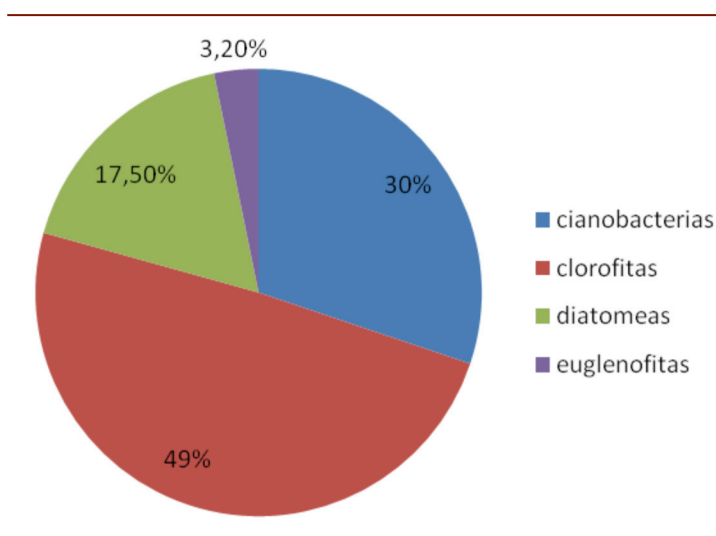


Figura 3. Porcentaje (%) de taxa de cianobacterias, clorofitas, diatomeas y euglenofitas presentes en los consorcios.

En los consorcios entre microalgas, las mayores frecuencias de aparición estuvo en el siguiente orden: *Chlorella* sp.> *Navicula* sp.> *Desmodesmus* sp. (Figura 4).

En cambio, en los consorcios entre cianobacterias, se distinguieron *Leptolyngbya* sp. y *Calothrix* sp. (Figura 5)

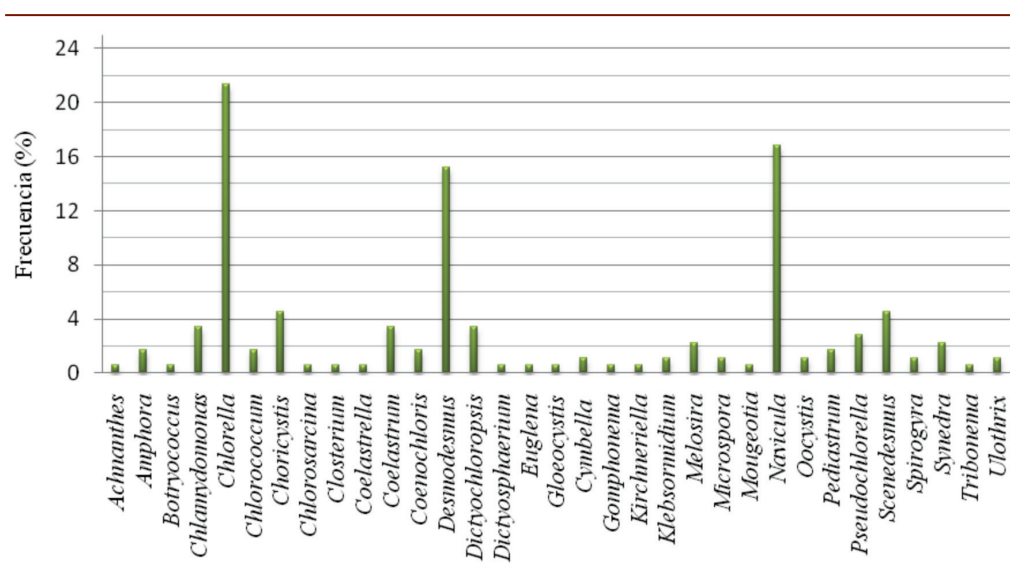
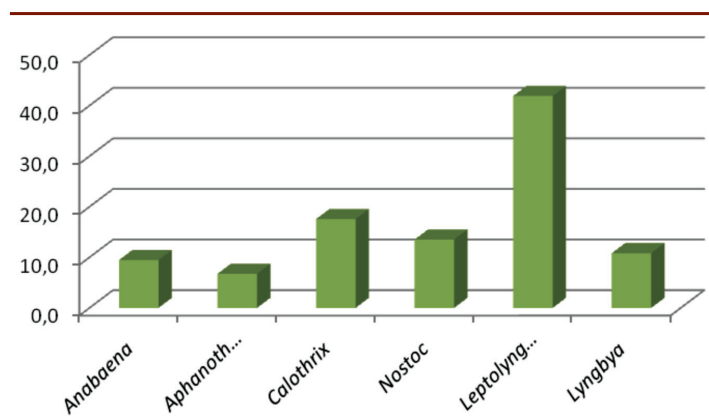


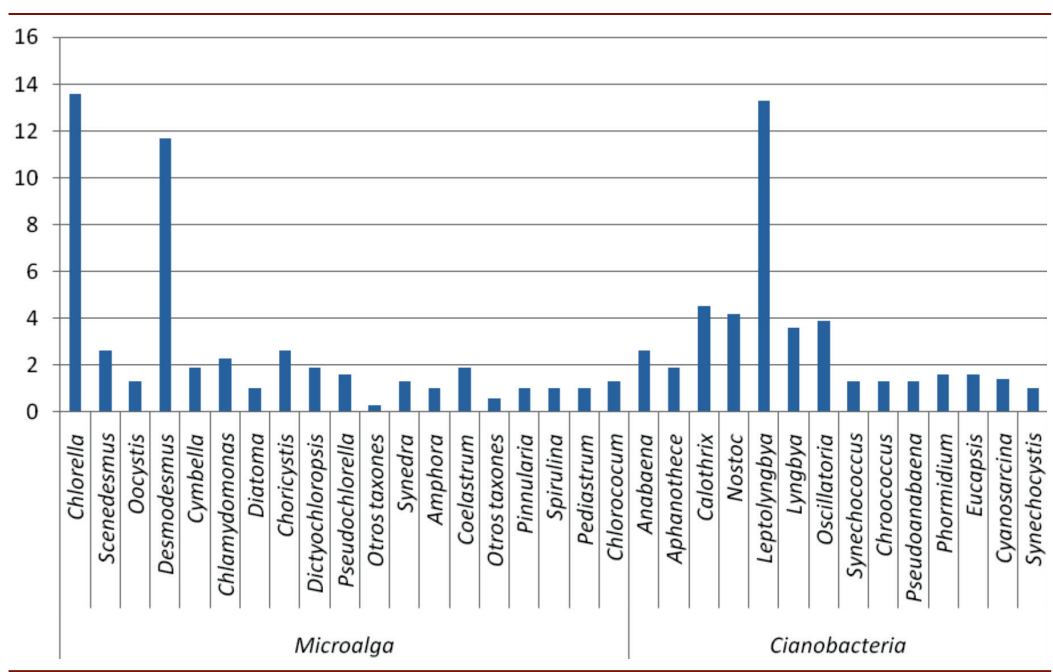
Figura 4. Diversidad y frecuencia (%) de taxa presentes en consorcio entre microalgas.



**Figura 5.** Diversidad y frecuencia de taxa presentes en consorcios de cianobacterias.

Al evaluar la diversidad y frecuencia de géneros en los consorcios microalga-cianobacteria, se destacó una alta presencia de *Chlorella* sp., *Desmosdesmus* sp. y *Leptolyngbya* sp., lo cual confirma el predominio de estos microorganismos en todas las muestras evaluadas, e incluso en las aisladas y mantenidas en colección. Por

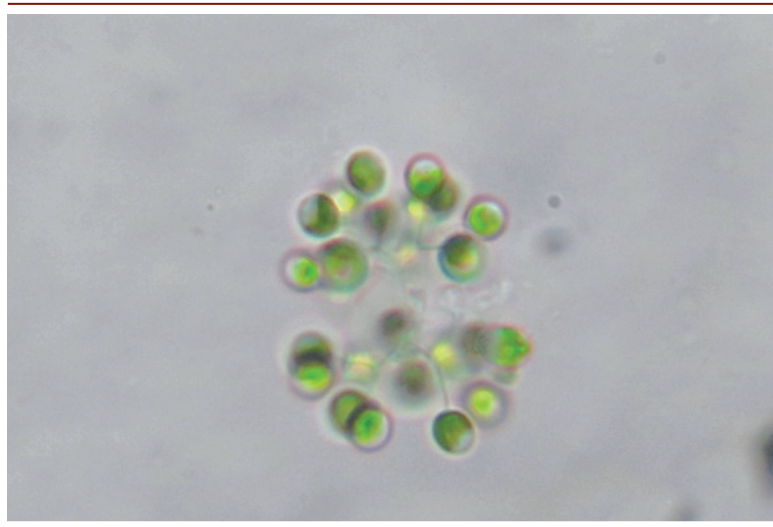
otra, parte se observó una baja frecuencia de los taxa: *Eunotia* sp., *Achnanthes* sp., *Selenastrum* sp., *Closterium* sp., *Cosmarium* sp., *Monoraphidium* sp., *Gloeocystis* sp., *Mougeotia* sp., *Spirogyra* sp., *Microcoleus* sp., *Trichodesmium* sp. y *Aphanizomenon* sp.; los cuales se incluyen en la Figura 6, como “otros taxa”.



**Figura 6.** Diversidad y frecuencia de taxa presentes en consorcios mixtos microalgas- cianobacterias. Otros taxa: *Eunotia* sp., *Selenastrum*, sp. *Cosmarium* sp., *Monoraphidium* sp., *Mougeotia* sp., *Gloeocystis* sp., *Spirogyra* sp., *Closterium* sp., *Achnanthes* sp., *Microcoleus* sp., *Trichodesmium* sp. y *Aphanizomenon* sp.

Se destaca la presencia de *Dictyosphaerium* sp. (Figura 7), encontrada en el sector del balneario de aguas termales de "Aguas Hediondas", Carchi, debido a que mantuvo con un predominio

significativo en relación con *Anabaena* sp., y *Cosmarium* sp., en consorcios microalgacianobacteria, durante cuatro meses en condiciones de laboratorio.



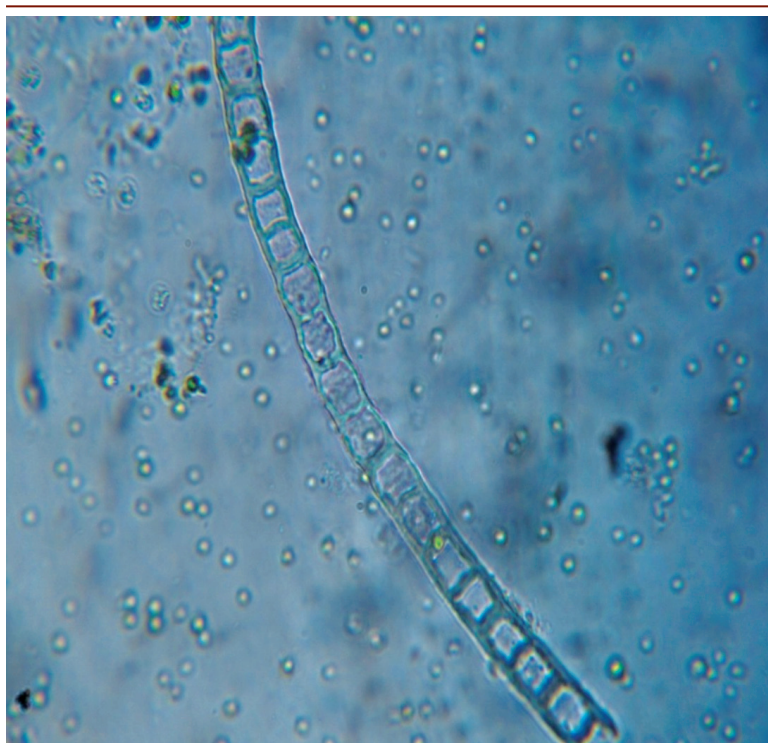
*Dictyosphaerium* sp. (40x)

**Figura 7.** *Dictyosphaerium* sp., Nägeli (1849). Observado solo en el sector de "Aguas Hediondas", Tufiño, provincia del Carchi, Ecuador.

*Dictyosphaerium* sp. Nägeli (1849), se caracteriza por su organización colonial esférica o irregular, envuelta por una matriz mucilaginosa, con 4-64 células esféricas u ovals conectadas por filamentos gelatinizados, las cuales forman una estructura cruciforme de ramificación dicotómica o tetracotómica y dispuestas perpendicularmente a la superficie de la colonia. Puede crecer en una variedad de hábitats de agua dulce, así como en embalses eutróficos y estanques (Krienitz *et al.*, 2012; Krienitz *et al.*, 2010).

*Microspora*, Thuret (1850), (Figura 8) también fue observada en el mismo sector de las aguas termales de "Aguas

Hediondas", provincia del Carchi y se caracteriza por presentar filamentos cilíndricos uniseriados y no ramificados. Su carácter taxonómico sobresaliente, corresponde a un engrosamiento diferencial de la pared celular, de modo que su parte próxima al septo transversal es siempre más gruesa y se va adelgazando hacia la porción media de la célula. En algunas ocasiones ocurre la ruptura del filamento en la parte media formándose así, fragmentos de pared celular con forma de H. Están distribuidas en hábitats acuáticos, particularmente entre algas filamentosas en arroyos, riachuelos, acequias y efluentes de minería con pH entre 3-6 (Guiry, 2013).



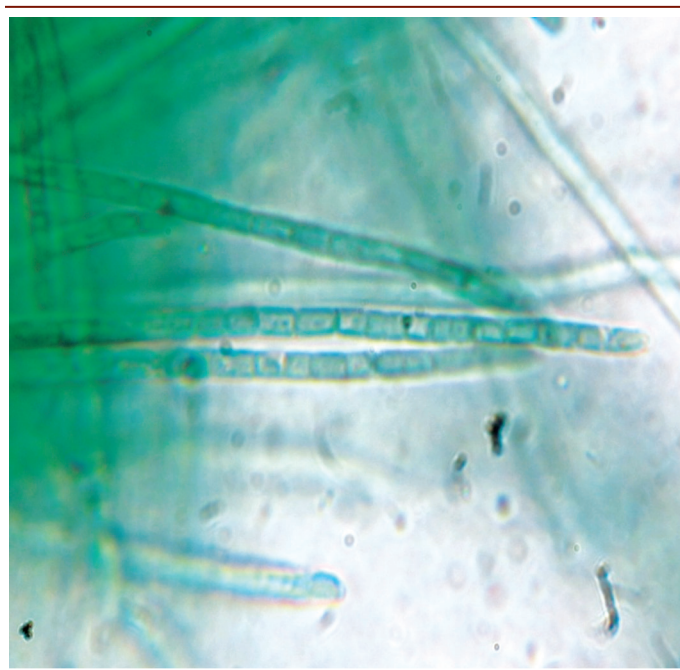
*Microspora* sp. (40x)

**Figura 8.** *Microspora* sp., Rabenhorst L (1868). Observado solo en el sector de "Agua Hediondas", Tufiño, provincia del Carchi, Ecuador.

Tanto *Dictyosphaerium* sp., como *Microspora* sp., fueron observadas solo en un sitio; ya que aparentemente su hábitat está asociado a ambientes de ese sector con abundantes aguas sulfurosas. No obstante, entre las cianobacterias se destaca *Leptolyngbya* sp., por ser la más distribuida en todas las localidades muestreadas (Figura 5 y 6), lo cual sugiere su capacidad adaptativa, incluso en condiciones estresantes de laboratorio, en cuanto a limitación de nutrientes, temperatura e iluminación, incluso al llegar a ser exclusiva

en muchos de los cultivos envejecidos (Abazari *et al.*, 2013).

Según Anagnostidis y Komárek (1988), *Leptolyngbya* se define como un clúster comprendido por los géneros tradicionales: *Lyngbya*, *Phormidium* y *Plectonema* (LPP grupo B). Las especies de este género (Figura 9) presentan filamentos delgados (0.5 a 3.5  $\mu\text{m}$ ), tilacoides parietales y con vainas facultativas. Varias especies son formadoras de clústeres o biofilms (Komárek, 2007; Albertano y Kováčik 1994).



*Leptolyngbya* sp. (100x)

**Figura 9.** *Leptolyngbya* sp., Anagnostidis y Komárek (1988), cianobacteria con mayor frecuencia observada en consorcios y en cultivos aislados.

## DISCUSIÓN

La fase de bioprospección de cepas de microalgas y de cianobacterias para ser incluidas en colecciones o banco de germoplasma, constituye la primera fase de exploración de aquellos ambientes naturales que pueden contener una rica biodiversidad o simplemente permite la detección de estos microorganismos en sitios únicos como de carácter endémico o asociados a otros mediante consorcios los cuales también representan un potencial para investigación desde el punto de vista ecológico, taxonómico, biotecnológico y ambiental.

Algunos de los hábitats analizados presentan características particulares y condiciona la adaptabilidad de las diversas especies a los mismos. En este caso, al

menos, la cepas de *Navicula* sp., *Cymbella* sp., *Diyctyosphaerium* sp., *Microspora* sp., y *Mougeotia* y las cianobacterias: *Phormidium* sp. y *Leptolyngbya* sp., encontradas en aguas termales de "San Vicente", Santa Elena y de "Aguas Hediondas", Carchi pueden ser consideradas de ambientes extremos.

La mayor riqueza específica observada en diatomeas y clorofitas parece indicar su posible adaptación a los distintos nichos ecológicos. Mientras que, las cianobacterias suelen ser altamente competitivas ante la deficiencia de nitrógeno y otros elementos, como en el caso de *Nostoc* sp., *Calothrix* sp., *Anabaena* sp. y *Leptolyngbya* sp. Además, de presentar elevada capacidad de adaptación a ambientes extremos de pH, deficiencia en nutrientes, alta irradiación solar, condiciones anóxicas, aguas sulfurosas, aguas eutróficas

y alcalófilas (Vincent, 2007). Entre las estaciones de muestreos que presentan condiciones extremas de pH, temperatura, aguas sulfurosas y condiciones anóxicas se encontraron en el Balneario de “Aguas Hediondas”, Carchi y en los baños termales de “San Vicente”, Santa Elena.

La elevada frecuencia de *Chlorella* sp., *Desmosdesmus* sp. y *Scenedesmus* sp. y de *Leptolyngbya* sp., en condiciones de laboratorio, confirma su alta adaptabilidad fisiocológica con respecto a otros microorganismos en consorcios. Además, llegaron a mantenerse exclusivas en muestras cultivadas durante el período de estudio, lo cual les confiere la susceptibilidad de ser aisladas rápidamente. *Chlorella* sp. y *Desmosdesmus* sp., logran surgir como organismos aislados a partir de consorcios, probablemente debido a la producción de compuestos inhibitorios para otros microorganismos. En cultivo, la competencia ecológica de *Chlorella vulgaris* mediante alelopatía sobre *Pseudokirchneriella subcapitata* ha sido descrita lo cual demuestra el efecto inhibitorio de chlorelina (Fergola et al., 2007).

También se demuestra que a partir de colectas de diferentes localidades, se establece una sucesión de especies, conforme van cambiando las condiciones de los cultivos en relación con la disponibilidad de nutrientes, temperatura, flora bacteriana asociada, iluminación, pH. Se pudo determinar que en muestras colectadas de laguna de Yahuarcocha y lago de San Pablo, Imbabura, se observó

un predominio de diatomeas (*Navicula* sp., *Epithemia* sp., *Diatoma* sp., *Gomphonema* sp., *Synedra* sp., *Nitzschia* sp. y *Melosira* sp.) al inicio de la evaluación; pero luego fueron sustituidas por clorofitas (*Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp. y *Scenedesmus* sp.) y en muchos casos por *Leptolyngbya*. Velasco et al., (1984), al realizar observaciones mensuales en un cultivo mixto o en consorcio, describen la sucesión de especies con un predominio de *Nitzschia* sp., luego sucedida por *Scenedesmus* sp., y por último una preponderancia de *Chlorella* sp.

La competencia se hace más evidente cuando a los cultivos de colección no se les suministra nutrientes periódicamente. Es por ello que se ha demostrado dominancia de algunas sobre otras y así pueden aparecer completamente aisladas, como producto de estas interacciones competitivas. En un estudio realizado sobre la influencia de la deficiencia de N y P en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* y de acuerdo con los modelos de competencia de Lotka-Volterra, se evidenciaron tres situaciones diferentes: exclusión competitiva de *S. acutus* por *C. vulgaris* en el tratamiento control; exclusión de alguna de las dos y la de coexistencia en el tratamiento con deficiencia de fósforo (González, 2010). En contraposición, en otras cepas de clorofitas, puede no ocurrir el mismo efecto y en este sentido se ha descrito coexistencia entre *Chlorella* sp., y *Chlorococcum* sp., en cultivos limitados en N, P y Fe; con lo cual se sugiere que las interacciones entre ambas especies no es afectada por ningún factor alelopático (Dow

*et al.*, 2006). Es posible que, el predominio de las cepas de *Chlorella sp.*, *Desmodesmus sp.* y *Scenedesmus sp.*, observadas, pueda deberse a la producción de compuestos alelopáticos; de tal manera que logren excluir a los demás microorganismos existentes previamente en los consorcios.

Tales estudios conllevan recomendar que durante el proceso de mantenimiento de consorcios en colecciones se deben monitorear periódicamente la riqueza específica en estos, así como seleccionar medios de cultivos selectivos para promover el crecimiento específico de cepas seleccionadas en función de sus requerimientos nutricionales.

En tanto la frecuencia de aparición de *Leptolyngbya sp.* (13 % de los cultivos aislados y en 13.3 % de los consorcios mixtos microalga-cianobacteria), sugiere también un elevado nivel competitivo de esta cianobacteria frente a otros microorganismos presentes en las muestras. Al respecto, Van der Grinten *et al.* (2004) al evaluar el efecto del fosfato en *biofilms* constituidos por las diatomeas, *Melosira varians*, *Nitzschia perminuta*, *Navicula trivialis* y *Achnanthes lanceolata* y por las cianobacterias, *Leptolyngbya foveolarum* y *Cylindrospermum stagnale*, demostraron que a diferentes concentraciones (0.5, 5.0 y 50.0  $\mu\text{M}$ ), en condiciones de laboratorio, *L. foveolarum* y en menor proporción, *Nitzschia perminuta*, predominaron a mayor concentración de fosfato, facilitado por el crecimiento expansivo y la excreción de inhibidores generados por *L. foveolarum*; por lo tanto, se postula como una cianobac-

teria con estrategia ecológica ante altas concentraciones de fosfato.

Así mismo, Van der Grinten *et al.* (2005), describen el efecto de la luz, temperatura, pH y nutrientes sobre un *biofilm* con *Leptolyngbya foveolarum* y *Nitzschia perminuta* y encuentran inhibición del crecimiento de la diatomea por parte de la cianobacteria, tanto a baja como a elevadas intensidades luminosas, incremento del pH y limitación de nutrientes.

Tales resultados, posiblemente, permitan explicar la elevada frecuencia de aparición de *Leptolyngbya* tanto en consorcios como en los cultivos donde resultó el único el microorganismo en perdurar; mientras no se le adicionaba medio de cultivo fresco a las muestras.

Por lo tanto, se recomienda realizar estudios sobre la ecofisiología de las diversas especies de *Leptolyngbya*, por cuanto se ha observado crecimiento de la misma en cultivos masivos de microalgas y en cultivos mantenidos en laboratorio. Además, podría ser utilizada para ficorremediación de efluentes y para formación de *biofilms* o de tapetes de sumo interés para biorremediación y acondicionamiento de suelos (Olguín y Sánchez-Galván, 2012; Soltani *et al.*, 2012).

En relación con *Dictyosphaerium sp.* y *Microspora sp.*, halladas en las aguas termales de Aguas Hediondas, se destacan por ser exclusivas de la zona y posiblemente *Dictyosphaerium sp.*, aún no han sido



reportadas para Ecuador (Gallo y Apolo, 2012), por lo cual amerita realizar en dicha área más estudios de bioprospección de microorganismos que puedan presentar interés en biotecnología o como bioindicadores de zonas sulfurosas y/o termófilas.

Las microalgas y cianobacterias aisladas, así como las mantenidas en consorcios, conforman un recurso biológico para investigación en biodiversidad y biotecnología; de allí el reto de conservar la colección de cultivos de forma sustentable, en medios de cultivo tanto líquidos como sólidos, según las condiciones óptimas de luz y temperatura, bien sea en cámaras de cultivo o a temperatura ambiente (Belkinova *et al.*, 2002).

El estudio realizado formaliza la metodología para detectar las diferencias en cuanto a riqueza específica, permanencia, abundancia, sucesión de taxa, durante el proceso de aislamiento; adicionalmente permite recomendar que las muestras originales deben ser mantenidas como fuentes de reclutamiento de microorganismos.

## CONCLUSIONES

• *Chlorella* sp. y *Desmodesmus* sp., resultaron los taxa más susceptibles de ser aislados, seguidos de *Leptolyngbya* sp. Se identificaron sitios de muestreos con elevada diversidad, tales como laguna "El Salado", San Gabriel, Carchi, laguna "Yahuarcocha" y lago "San Pablo", Imbabura y uno con exclusividad de taxa balneario de "Aguas Hediondas", Carchi, en el cual se encontró *Dictyosphaerium* sp.,

*Microspora* sp. y *Mougeotia* sp.

• Se demuestra que los consorcios clasificados en microalga-microalga, cianobacteria-cianobacteria y microalga-cianobacteria, constituyen microsistemas biológicos que deben ser conservados en las colecciones de cultivos.

• *Chlorella* sp. y *Desmodesmus* sp., fueron las microalgas más susceptibles de ser aisladas dadas sus capacidades de adaptación a condiciones de laboratorio. Mientras que la cianobacteria *Leptolyngbya* demostró ser altamente competitiva, adaptándose en cultivos deficientes en nutrientes, envejecidos y deshidratados.

## AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por haber facilitado las condiciones para la realización de la presente investigación y por ser la depositaria de la colección de microalgas y cianobacterias. Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación (Ecuador).

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abazari M, Zarrini G y Rasooli I. 2013. Antimicrobial Potentials of *Leptolyngbya* sp. and Its Synergistic Effects With Antibiotics. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(5): e6536.

- Albarracín I, Cravero M, Salomón R, Pío G, Otaño S, Morison S, Parra A y Prósperi C. 2009. Desarrollo del laboratorio de microalgas en Patagonia Argentina. Facultad de Ciencias Naturales. UNPSJB Trelew-Chubut. Argentina.
- Albertano P y Kováčik L. 1994. Is the genus *Leptolyngbya* (Cyanophyte) a homogeneous taxon? *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies*, **75**: 37–51.
- Anagnostidis K y Komárek J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3–Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies*, **50–53**: 327–472.
- Arredondo Vega BO. 1997. Colección de microalgas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). 22–23. CONACyT. México DF. México.
- Australian National Algae Culture Collection (ANACC). 2012. CSIRO Microalgae Supply Service. 2010. Página de Internet: [www.csiro.au/en/Organisation-Structure/National-Facilities/Australian-National-Algae-Culture-Collection](http://www.csiro.au/en/Organisation-Structure/National-Facilities/Australian-National-Algae-Culture-Collection) Consultada junio-2013.
- Banco Español de Algas (BEA). 2008. Proyecto: Microalgas. Subproyecto: Creación y Consolidación del Banco Español de Algas (BEA). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.
- Belkinova D, Kirjakov I y Mladenov R. 2002. Catalogue of the strains of Plovdiv Algal Culture Collection (PACC), *Trav. Sci. Univ. Plovdiv, Plantarum*, **38(6)**: 3–78
- Billard C. 1987. L'algothèque du laboratoire d'algologie fondamentale et appliquée de l'Université de Caen. *Cryptogamie Algologie*, **8(2)**, 79–90.
- Bourrelly P. 1981. Les Algues d'Eau Douce. Tome I. Les Algues Vertes. Second Edition. N. Boubée et Cie, Paris. 576 pp.
- Buitrago E, Llano M y Frontado K. 1999. El banco de cepas de microalgas de la Estación de Investigaciones Marinas de Margarita, Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Venezuela. MEMORIA. *Fundación La Salle de Ciencias Naturales*. Tomo LIX, **151**: 67–73.
- Castree N. 2003. Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*, **28(1)**: 35–55.
- Delgadillo I, Góngora F y Medellín F. 2009. La colección de microalgas de la Universidad Pedagógica Nacional como estrategia didáctica para la enseñanza y aprendizaje de conceptos biológicos. Número Extraordinario. 4° Congreso Internacional sobre Formación de Profesores de Ciencias. Colombia.

- Dow AR, Gilliland JL, Raymond RA y Shiring JJ. 2006. Competition between *Chlorella* sp. and *Chlorococcum* sp.: a study in nutrient limitation. *Journal of Ecological Research*, **8**:20–25.
- Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE, Fran-son MAH. 1995. Key for identifica-tion of freshwater algae common in water supplies and polluted water. En *Standar Methods for the Exami-nation of water and wastewater*. 19th Ed. *American Public Health Asso-ciation*. Washington.
- Fergola M, Cerasuolo A, Pollio Pinto G y DellaGreca M. 2007. Allelopathy and competition between *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella sub-capitata*: Experiment and mathemati-cal model. *Ecological Modelling*, **208**: 205–214.
- Fernández-Concha GC., Sosa V, León de la Luz JL. y León-Cortés J. 2004. Colecciones biológicas de los centros de investigación CONACyT- México DF. México.
- Friedl T y Lorenz M. 2012. The culture collection of algae at Göttingen University (SAG): a biological resource for biotechnological and biodiversity research. *Procedia Environmental Sciences*, **15**: 110–117.
- Gallo N y Apolo B. 2012. Fundamentos de Ficología. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador: 120 pp.
- García G. 2011. Memoria Anual de Productividad. Banco Español de Algas. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España.
- GBIF. 2009. Nodo Nacional de Información de Biodiversidad. Informe de colecciones y bases de datos de biodiversidad en España.
- González L. 2010. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. *Tesis de Magister Scientiarum en Ciencias Biológicas*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- González MA, Cifuentes AS, Inostroza I y Gómez PI. 2008. Colección de microalgas. Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- González MA, Parra O y Cifuentes AS. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: *Manual de Métodos Ficológicos*. Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC y Sar E. (eds.), Universidad de Concepción, Chile. pp 219–250.
- Guiry MD. En Guiry MD y Guiry GM. 2013. Algae Base. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>

- Komárek J. 2007. Phenotype diversity of the cyanobacterial genus *Leptolyngbya* in the maritime Antarctic. *Polish Polar Research*, **28** (3): 211–231.
- Komárek J y Anagnostidis K. 2005. Teil: Cyanoprokaryota-2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales En Büdel B, Krienitz L, Gärtner G y Schagerl M. (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa. 19/2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg. 759 pp.
- Komárek J y Anagnostidis K. 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4. Nostocales. *Archives für Hydrobiology Suppl./Algological Studies*. **82**: 247–345.
- Krammer K y Lange-Bertalot H. 1991. Bacillariophyceae. 1. Naviculaceae. En Ettl H, Gerloff J, Heynig H y Mollenhauer D. (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/1. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, New York. 876 pp.
- Krienitz L, Bock C, Kotut K y Pröschold T. 2012. Genotypic diversity of *Dictyosphaerium*-morphospecies (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) in African inland waters, including the description of four new genera. *Fottea*, **12**(2): 231–253.
- Krienitz L, Bock C, Luo W y Pröschold T. 2010. Polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium* morphotype within Chlorellaceae (Trebouxiophyceae). *Journal of Phycology*, **46**(3): 559–563.
- Lascuráin M, List R, Barraza L, Díaz Pardo E, Gual Sill F, Maunder M, Dorantes J y Luna VE. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Capital Natural de México. Estado de Conservación y Tendencias de Cambio. *Conabio*, **2**(12): 517–544, México.
- López-Adrián S y Barrientos-Medina RC. 2005. La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida: 55 pp. México.
- Montes de Oca N, González R, Riverón Y, Núñez A, Villoch A y Rodríguez N. 2008. Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del CENSA. *Rev. Salud Animal*, **30**(1): 17–24.
- Mora López M. 2010. Evaluación de la potencialidad biotecnológica y biodiversidad de microorganismos fotosintéticos extremófilos de Costa Rica. Proyecto-062–07. Universidad de Costa Rica.
- Olguín EJ y Sánchez-Galván G. 2012. Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnology*, **30**(1): 3–8.
- Ortega MM. 2009. Herbario Ficológico. Facultad de Biología, Universidad

- Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- Rumrich U, Lange-Bertalot H y Rumrich M. 2000. Diatoms of the Andes from Venezuela to Patagonia/Tierra del Fuego and two additional contributions. In: Lange-Bertalot, H. (ed.), *Iconographia Diatomologica. Annotated Diatoms Micrographs. Vol. 9. Phytogeography-Diversity-Taxonomy*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany. 672 pp.
- Santos L. 2008. Algoteca de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Coimbra (FCTUC). Portugal.
- Serrano A, Mateo P y Perona E. 2004. Estructura y composición de la comunidad de cianobacterias bentónicas de un arroyo de montaña mediterráneo, el arroyo Mediano (Madrid). *Limnética*, **23**(1-2): 83–94.
- Soltani N, Baftechi L, Dezfulian M, Shokravi S y Alnajar N. 2012. Molecular and Morphological Characterization of Oil Polluted Microalgae. *International Journal of Environmental Research*, **6**(2): 481–49.
- Starr R. 2010. The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (UTEX).
- Stein JR. 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, England: 448 pp.
- Van der Grinten E, Janssen APHM, De Mutsert K, Barranguet C y Admiraal W. 2005. Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia*, **548**(1–3): 267–278.
- Van der Grinten E, Janssen APHM, Simis SGH, Barranguet C y Admiraal W. 2004. Phosphate regime structures species composition in cultured phototrophic biofilms. *Freshwater Biology*, **49**(4): 369–381.
- Velasco Díaz JL, Álvarez Cobelas M, Colmenarejo Morcilla JM, Bustos Aragón A. y Parra Sánchez-Bravo F. 1984. Estudio de laboratorio sobre algas aisladas a partir de aguas residuales urbanas. Secretariado de Publicaciones. Universidad de Murcia. España. *Anales de Biología*, **2**: 191–195.
- Vergara C. 2009. Descripción de métodos de recolección y conservación de algas. Herbario de la Universidad de Panamá.
- Vincent W. 2007. Cold tolerance in cyanobacteria and life in the cryosphere. En: Seckbach J (ed.) *Algae and cyanobacteria in extreme environments*, Springer. Heidelberg: 289–304.