

**DISTRIBUCIÓN DE LAS BACYLLARIOPHYTAS *Cyclotella glomerata* y  
*Nitzschia sp2.*, Y LA CIANOBACTERIA *Oscillatoria sp.* EN LA CIÉNAGA  
GRANDE DE SANTA MARTA, CARIBE COLOMBIANO Y SU AISLAMIENTO  
EN LABORATORIO.**

**ROSA CAROLINA ANGARITA VASQUEZ**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA**

*SANTA MARTA*

**2001**

**DISTRIBUCIÓN DE LAS BACYLLARIOPHYTAS *Cyclotella glomerata* y  
*Nitzschia sp2.*, Y LA CIANOBACTERIA *Oscillatoria sp.* EN LA CIÉNAGA  
GRANDE DE SANTA MARTA, CARIBE COLOMBIANO Y SU AISLAMIENTO  
EN LABORATORIO.**

**ROSA CAROLINA ANGARITA VÁSQUEZ**

Tesis de grado para optar al título de Bióloga Marina

**DIRECTOR**

**GLORIA E. SÁNCHEZ**

**Especialista en Acuicultura**

**ASESORES**

**PhD. EVER MORALES**

**Universidad del Zulia (Maracaibo – Venezuela)**

**MSc. GABRIEL GUILLOT**

*Universidad Nacional de Colombia*

*FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO*

**FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA**

**SANTA MARTA**

**2001**

## CONTENIDO.

	Pág
INTRODUCCION	20
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. AREA DE ESTUDIO	26
4. MARCO TEORICO	29
5. METODOLOGIA	34
5.1. MONITOREO DE FITOPLACNTON	34
5.1.1. Muestreos en el medio natural	34
5.1.2. Análisis de muestras	35
5.1.2.1. Análisis biológico	35
5.1.2.2. Análisis químico	35
5.1.2.2.1. Clorofila	35
5.1.2.2.2. Determinación de fosfato	36
5.1.2.2.3. Determinación de silicato reactivo	36
5.1.2.2.4. Determinación de amonio	36
5.1.2.2.5. Determinación de nitrito	37
5.1.2.2.6. Determinación de nitrato	37

5.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CEPAS DE MICROALGAS EN LABORATORIO	37
5.2.1. Esterilización de material	37
5.2.2. Parámetros de cultivo	38
5.2.3. Medios de cultivo	38
5.2.3.1. Medio f/2	38
5.2.3.2. Medio algal	39
5.2.4. Técnicas de aislamiento	40
5.2.4.1. Aislamiento por medio de capilares modificados y lavados sucesivos.	40
5.2.4.2. Aislamiento por dilución	41
5.2.4.3. Aislamiento por rayado de agar	41
5.2.5. Recuento celular	42
5.2.6. Ensayos	42
5.2.7. Descripción de las especies estudiadas	43
5.2.7.1. Descripción de <i>Cyclotella glomerata</i>	44
5.2.7.2. Descripción de <i>Nitzschia sp2.</i>	45
5.2.7.3. Descripción de <i>Oscillatoria sp.</i>	46
6. RESULTADOS Y DISCUSION	47
6.1. <i>Cyclotella glomerata</i>	47
6.1.1. Monitoreo de la especie <i>C. glomerata</i> en el medio natural	47
6.1.2. Manejo en laboratorio	48
6.1.2.1. Pre – ensayo con diferentes medios de cultivo para el aislamiento de la especie <i>C. glomerata</i>	48

6.1.2.2. Aislamiento en condiciones de laboratorio	51
6.1.3. Ensayo con <i>C. glomerata</i>	52
6.2. <i>Nizschia sp2</i>	56
6.2.1. Monitoreo de la especie <i>Nizschia sp2</i> en el medio natural	56
6.2.2. Manejo en laboratorio	64
6.2.2.1. Pre – ensayo con diferentes medios de cultivo para el aislamiento de la especie <i>Nizschia sp2</i>	64
6.2.2.2. Aislamiento en condiciones de laboratorio	68
6.2.3. Ensayos con <i>Nizschia sp2</i>	69
6.3. <i>Oscillatoria sp</i>	78
6.3.1. Monitoreo de la especie <i>Oscillatoria sp</i> en el medio natural	78
6.3.2. Manejo en laboratorio	79
6.3.2.1. Pre – ensayo con diferentes medios de cultivo para el aislamiento de la especie <i>Oscillatoria sp</i>	79
6.3.2.2. Aislamiento en laboratorio	84
6.3.3. Ensayos con <i>Oscillatoria sp.</i>	85
7. CONCLUSIONES	86
8. RECOMENDACIONES	88
9. BIBLIOGRAFIA.	89

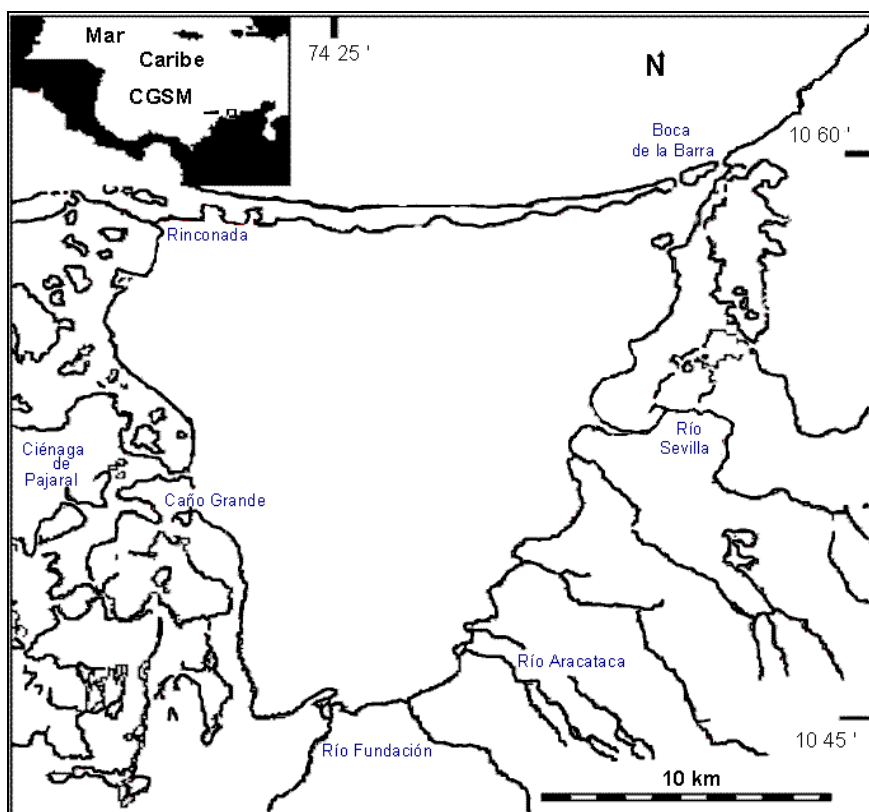
## 2. JUSTIFICACIÓN

La Ciénaga Grande de Santa Marta presenta cambios progresivos en la estructura del fitoplancton a consecuencia de los cambios en las condiciones ambientales.

Vidal sostiene que las especies *Cyclotella glomerata*, *Nitzschia sp2*, *Oscillatoria sp.* y *Actinocyclus normanii* son especies bien representativas durante la época de invierno de la zona (Septiembre a Diciembre) y con ensayos en laboratorio de estas especies se podría explicar la dinámica hidrobiológica del sistema lagunar; sin embargo *C. glomerata*, *Nitzschia sp2* y *Oscillatoria sp.* no se encuentran aisladas en laboratorio, por lo tanto se hace necesario realizar ensayos para su aislamiento y mantenimiento en recintos cerrados para así realizar posteriormente cualquier tipo de tratamientos con dichas especies.

### 3. ÁREA DE ESTUDIO

El sistema lagunar estuarino conocido como Ciénaga Grande de Santa Marta (Mapa 1), hace parte del delta exterior del Río Magdalena y se ubica entre las latitudes  $10^{\circ} 40'$  y  $10^{\circ} 59'N$  y longitudes  $74^{\circ} 15'$  y  $74^{\circ} 38'W$  en la costa Caribe de Colombia (IGAC, 1973).



Mapa 1. Área de estudio Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM).

El área aproximada cubierta por el sistema estuarino (lagunas, riachuelos y pantanos de manglar) es de 450.000 ha; que comprende dos cuerpos principales de agua, Ciénaga Grande y Ciénaga de Pajarales, también lagunas menores, como ciénagas La Redonda, La Luna, Ahuyama, Tigre, Conchal, Juncal, Aguja, Piedra, Cuatro Bocas, Atascosa, Torno, Pozo Vede, conectadas por riachuelos y canales (Botero y Mancera, 1996).

El complejo lagunar recibía las aguas del Río Magdalena a través del caño Clarín y de otros caños (Aguas Negras, Renegado, Salado, Shiller) que comunicaban con las ciénagas menores pertenecientes al complejo de Pajarales (Botero, 1988). Al Este y Sur limita con las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM), desde donde provienen cuatro ríos principales que desembocan directamente en la Ciénaga Grande de Santa Marta; al Norte esta separada del mar Caribe por una isla de barrera conocida como Isla de Salamanca que tiene una boca de 200 m a 300 m de ancho y 10 m de profundidad en su parte Oriental (Boca de la Barra), donde se conecta la ciénaga directamente con el mar (Botero op cit, 1988). El sistema hidrológico era dominado por la alternancia de inundaciones causadas por las aguas del Río Magdalena en época de lluvias y la subsiguiente desecación de grandes áreas durante la época seca (Ensminger, 1997).

Durante la época lluviosa mayor, los vientos del Sur y el Suroeste, junto con la inundación ocasionada por lluvias o por el desborde del Río Magdalena, favorecen el transporte de agua del complejo lagunar hacia el mar (Escobar, 1991). Los periodos de lluvia y de sequía en el Delta Exterior del Río Magdalena DERM-CGSM, están bien definidos presentándose una época seca mayor de Diciembre hasta Abril, una época lluviosa menor de Mayo a Junio, una época seca menor desde Julio hasta Agosto y de Septiembre a Noviembre la lluviosa mayor (Wiedemann, 1973).

El clima de la zona es seco árido, con seis a siete meses de sequía al año y un déficit anual de agua de 1031 mm/año ya que la evapotranspiración (1431 mm/año) excede ampliamente la precipitación (400 mm/año) (International Global Atmospheric Chemistry (IGAC), 1973). Este tipo de clima indica que la vegetación predominante corresponde a la zona de vida de bosque seco tropical en las áreas inúndables predominan los bosques de manglar, constituidos por *Rizophora mangle* (L.) L., *Avicenia germinans* (Lineo) Stearn, *Laguncularia racemosa* (Gaertn) y en menor proporción *Conocarpus erectus* (L) (González, 1991).



Desde el punto de vista fisiográfico el delta exterior del Río Magdalena incluye tres paisajes diferentes: planicie fluvio-marina, planicie aluvial y planicie aluvial de pie de monte (Márquez, 1982), estos son los resultados de la localización geográfica inter tropical y de la influencia local del mar Caribe y el Río Magdalena.

#### 4. MARCO TEÓRICO

En general las microalgas presentan, altas tasas de reproducción, de tal forma que la biomasa algal se puede duplicar cada 24 horas; además tienen cortos ciclos de vida, adaptabilidad a distintas condiciones ambientales, alta eficiencia fotosintético y crecimiento autótrofo, heterótrofo y/o mixotróficos (Sánchez, 2000), lo que las hace un grupo de organismos de gran interés para el estudio de diferentes factores ambientales.

Los ecosistemas acuáticos tienen flora y fauna asociada característica, denominadas autóctonas del medio, algunos de estos individuos son utilizados como indicadores de la calidad del agua; dentro de estas comunidades se encuentra el fitoplancton, que son formas vegetales microscópicas que cumplen la función de productor primario, (Roldan, 1989). El fitoplancton de agua dulce esta constituido por un enorme número de especies microscópicas que pertenecen a las : Clorofitas, cianofitas, euglenofitas, crisofitas y pirrofitas. En el fitoplancton marino predominan las diatomeas, dinoflagelados, cocolitoforidos, crisomonadales y muy pocas cianofitas.

La mayoría de las especies de la clase Bacillariophyceae son microscópicas, unicelulares y de gran uso en laboratorios marinos comerciales; las diatomeas en general tienen un citoplasma provisto de núcleo, vacuolas, cloroplastos y a menudo pirenoides. Los cromatóforos varían en número y en forma, se presentan de color amarillo pardo y a veces, en tono verdoso, características que están sujetas a la cantidad de luz, nutrientes y minerales (Norstog y Long, 1976). Las diatomeas bénticas revisten importancia nutricional cuando son empleadas directamente como alimento para postlarvas y juveniles de camarón y peces.

Las cianobacterias, han sido consideradas responsables de la temprana acumulación de oxígeno en la atmósfera terrestre; ellas se encuentran en aguas de variado rango de salinidad y temperatura, en suelos húmedos y en rocas. Estas algas plantónicas microscópicas tienen gran interés para los laboratorios marinos comerciales y también para la industria. Las especies de mayor importancia en la acuicultura son: *Spirulina sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Anabaena sp.* y *Microcystis sp.*, las cuales poseen un elevado porcentaje de proteína, son fáciles para cultivo masivo y son usadas en la fabricación de dietas para organismos superiores incluyendo el hombre (Stadler et al., 1988).

La explotación de las algas a gran escala implica, como primera medida, la necesidad de una adecuada información sobre la abundancia y distribución de las especies, del conocimiento de sus ciclos vitales y de sus posibilidades de explotación.

El objetivo general de la rehabilitación de la CGSM es devolver al ecosistema las características físicoquímicas (nutrientes, salinidad y transparencia), y la diversidad de especies que en el proceso de intervención del hombre con la construcción de la carretera entre Barranquilla y Santa Marta provocó disturbios severos que afectaron directamente las características esenciales del sistema.

Vidal en 1987 en la CGSM realizó muestreos quincenales con la finalidad de observar la distribución y dinámica de la estructura fitoplanctónica; encontrando las especies más importantes por presencia y abundancia eran:

Tabla 1. Especies más importantes en la Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM) durante 1987.

GRUPO AL QUE PERTENECE	especies fitoplacntonicas
Diatomea Céntricas	<i>Actinocyclus normanni</i>
Diatomea Penada	<i>Nitzschia closterium</i> <i>Neodelphineis pelagica</i>
Cianofitas	<i>Chroococcus turgidus</i>

Dinoflagelado	<i>Scrippsiella trochoidea</i>
---------------	--------------------------------

Además concluye que los diferentes grupos del fitoplancton se remplazan en el tiempo, de una manera ordenada, presentándose primero y casi simultáneamente las diatomeas céntricas (DC) y las diatomeas penadas (DP), luego los dinoflagelados (DI) y finalmente las cianofitas (Ci). Las DC presentan además, varios picos de abundancia, importantes a lo largo del ciclo anual.

Una de las características más importante en la composición de la comunidad fitoplanctónica en la CGSM, es la relativamente estable composición de especies antes de la apertura de los caños. En estudios realizados por Vidal (1995) y Mancera (1995), indican que la comunidad fitoplanctónica esta compuesta entre 240 - 270 taxas, aunque solo 10 taxones, dominaron más del 90 % de la estructura de la comunidad. Las taxas siguientes se organizan por orden de importancia en el cuerpo de agua, de acuerdo a lo descrito por los autores anteriores:

Tabla 2. Especies más importantes en la Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM) durante 1995.

GRUPO AL QUE PERTENECE	ESPECIES POR ORDEN DE ABUNDANCIA
Cianofitas	<i>Oscillatoria sp.</i>
Diatomeas Céntricas	<i>Actinocyclus norman</i>
Cryptophyta	<i>Hemiselmis sp.</i>
Diatomeas Céntricas	<i>Cyclotella glomerata</i>
Diatomea Penada	<i>Nitzchia closterium</i>
<i>Cianofitas</i>	<i>Chroococcus turgidus</i>
Dinoflagelado.	<i>Scrippsiella trochoidea</i>
Diatomeas Céntricas	<i>Skeletonema costatum</i>
Diatomeas Céntricas	<i>Chaetoceros sp 1.</i>
Diatomea Penada	<i>Neodelphineis pelagica</i>

Vidal (1995), concluye que la diversidad y abundancia de los taxones encontrados en la Ciénaga Grande de Santa Marta están significativamente asociados a los cambios de la salinidad y la transparencia del agua; así mismo que la diatomea céntrica *Actinocyclus normanni* presenta alta demanda de sílice y la presencia de esta especie se alterna a través del tiempo y del espacio, con la cianofita filamentosa *Oscillatoria sp.* De igual manera, encontró que *Cyclotella glomerata*, (otra diatomea céntrica más pequeña que *A. normanni*), se encuentra en altas densidades asociada a *Oscillatoria sp.*; esto se debe aparentemente a que hay un alto consumo de fósforo por parte bien sea de *Cyclotella sp.* o por *Oscillatoria sp.*

Mancera y Vidal en 1994 entre los meses de julio y agosto, reportaron la presencia de un fenómeno discontinuo de muerte masiva de peces en la CGSM.; el primer evento se presentó del 15 al 19 de julio, el segundo alrededor del día 20 de agosto y el tercero, entre el 21 y 26 del mismo mes. La presencia en altas concentraciones de otra cianofita filamentosa, *Anabaenopsis sp.* altamente tóxica, podría estar relacionada con las causas del primer evento. Un incremento en las concentraciones de fósforo y luego el florecimiento de nano y picoplancton, especialmente de cianofitas y algas flageladas, explicarían las condiciones anóxicas e hipóxicas presentadas en el tercer evento, las cuales pudieron causar la muerte masiva de peces. Otra posible causa de dicha mortalidad, podría ser la liberación de gases tóxicos desde el sedimento y la anoxia, debida a la actividad bacteriana.

Botero *et. al*, en 1995, reportan la proliferación nociva de fitoplancton, en la CGSM. fenómeno causado por organismos que en determinadas condiciones ecológicas, se multiplican rápidamente, generando muchas veces, severas repercusiones al ser humano, pudiendo afectar su salud y economía. Los análisis de laboratorio realizados en el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) descartan contaminantes químicos como organoclorados, organofosforados o carbamatos. Las causas del problema están relacionadas con la proliferación de fitoplancton, proceso natural agravado en este caso por la eutroficación de las aguas; el crecimiento excesivo de microalgas trajo como

consecuencia prolongados episodios de anoxia, con severas consecuencias para los peces y demás recursos pesqueros.

En cuanto al cultivo de microalgas González, *et al.* (1995), realizan una recopilación de técnicas para su cultivo en laboratorio, donde se incluyen los procedimientos para el cultivo preparación de medios de cultivo, aislamiento de cepas, purificación de cultivos, etc.

Paniagua *et al* (1986) presentaron las técnicas para el cultivo masivo de microalgas, selección de especies, medios de cultivo en agua de mar, etc., utilizados en el laboratorio del ICLAN.

Dentro de los parámetros que se tienen en cuenta para la selección de una especie microalgal con fines de cultivo en acuicultura son: tasas altas de división celular y facilidades para alcanzar y mantener altas densidades de cultivo, ausencia de emisión de metabolitos tóxicos y capacidad de crecimiento en ausencia de bacterias y/o otros parásitos, para su posterior utilización; pared celular fina, que permita una fácil digestibilidad; fácil obtención de la semilla y bajo costo para su mantenimiento en laboratorio (Sánchez, 1998); estas características las reúne los siguientes grupos taxonómicos: Bacillarioficeae, Haptoficeae, Crisoficeae, Cianoficeae, Prasinoficeae y Cloroficeae.

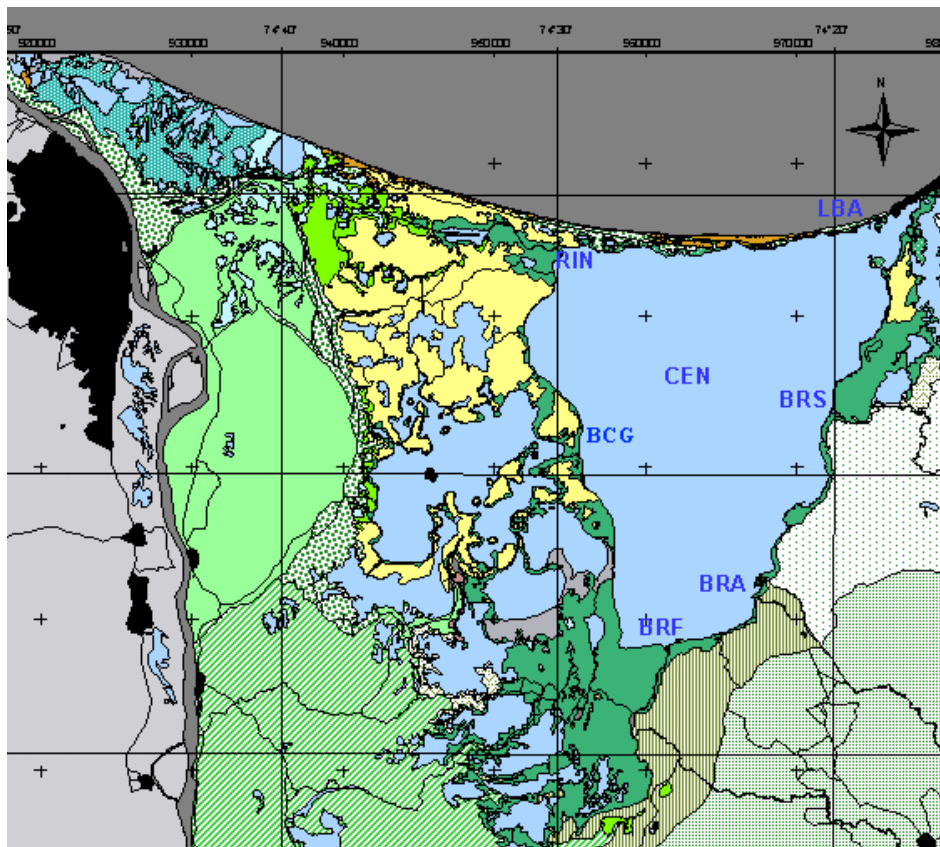
El estudio de las microalgas nativas en condiciones de laboratorio es un aspecto de gran importancia; Sánchez (2000), realizó el aislamiento y mantenimiento en laboratorio de varias especies de microalgas del embalse del Guajaro, ubicado en el departamento del Atlántico, con el propósito de establecer un cepario con dichas especies como punto de partida para futuras investigaciones en el campo de la biotecnología, ecología, taxonomía, etc.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Monitoreo de fitoplancton

#### 5.1.1 Muestreos en el medio natural

Se escogieron siete estaciones representativas de la C.G.S.M., teniendo en cuenta las condiciones ambientales de cada una de ellas; la Boca de la Barra, desembocadura de los Ríos Fundación, Sevilla y Aracataca y del Caño Grande, Rinconada y el Centro (Mapa 2).



Mapa 2. Ubicación de las estaciones en la CGSM.

En cada muestreo se tomaron muestras de agua superficial en frascos de 1 L para análisis cuantitativo y cualitativo de fitoplancton y en frascos de 0.5 L

para los análisis químicos como pigmentos (clorofila, feopigmentos) y nutrientes (ortofosfatos, nitritos, nitratos, silicatos y amonio). Las muestras refrigeradas posteriormente fueron analizadas en el laboratorio.

En campo por cada estación se registraron los siguientes parámetros: temperatura del agua superficial, intensidad lumínica a nivel del agua con luxómetro (Extech), profundidad, turbidez con el disco secchi, nubosidad en octavos, color del agua y altura de la ola. Igualmente se registraron los valores de pH con un peachimetro (WTW pH 330), concentración y porcentaje de saturación de oxígeno con el oxímetro (WTW oxi 330); salinidad del agua por medio de un Salinómetro (WTW sal 330) y conductividad.

### 5.1.2 Análisis de muestras

5.1.2.1 Análisis biológico. Las muestras biológicas se pasaron a través de filtro de 140  $\mu\text{m}$  de poro acoplados a un tubo, para deshacerse del zooplancton mas grande; para el recuento se utilizaron placas del sistema de cámaras Utermohl en microscopio invertido, aplicando la metodología de Vidal 1995.

### 5.1.2.2 Análisis químico

5.1.2.2.1. Clorofila. La concentración de las clorofilas es una medida relativa para la abundancia del fitoplancton en el agua; para su determinación se siguió la metodología de la UNESCO 1966 que consiste en filtrar la muestra a través de un filtro de vidrio, se extraen los pigmentos con el solvente acetona al 95 % y determina las extinciones en un espectrofotómetro a ciertas longitudes de onda. Aplicando fórmulas específicas se pueden calcular las concentraciones individuales de las clorofilas  $\underline{a}$ ,  $\underline{b}$  y  $\underline{c}$  (UNESCO, 1966), de las cuales la clorofila  $\underline{a}$  es la más importante.

5.1.2.2.2. Determinación de Fosfato. El presente método en el análisis de fosfato inorgánico en el agua de mar, sigue esencialmente el método calorimétrico de Murphy y Riley (1962), el cual esta basado en la formación de un color azul intenso del complejo fosfo - molibdato. El procedimiento



modificado por Kremling y Wenk (1986) fue el empleado en este trabajo. El método muestra efectos no medibles de la salinidad pero pueden inferir, con la relativamente alta concentración de iones de silicatos, arseniatos ó sulfuro de hidrógeno. La absorbancia es proporcional a la concentración de fosfatos, por encima de 28 mol/l cuando se mide en celdas de 1 cm.

5.1.2.2.3. Determinación de Silicato reactivo. La determinación de los compuestos de sílice disuelto, esta basado en la formación de un ácido poliprótico cuando la muestra es tratada con una solución de molibdato. Este ácido silico - molibdico, se da en dos formas ionicas, es entonces reducido a un complejo azul intenso por la adición del ácido ascórbico como reductor. El color se forma en 30 minutos y es estable por algunas horas, determinándose a 810 nm. El método descrito aquí, sigue el procedimiento descrito por Koroleff (1983) (en Kremling y Wenk, 1986), y tiene un rango de concentración por encima de 80 mol/l (muestras con altas concentraciones son diluidas con agua destilada desionizada); el método solo da la concentración del silicato reactivo. Se observan interferencias, por la salinidad, la cual reduce el intenso color final, en algún grado.

5.1.2.2.4. Determinación de Amonio. El método es específico para amonio y esta basado en la formación del color azul de indofenol, por el fenol y el hipoclorito en la presencia de las especies  $\text{NH}_4$  y  $\text{NH}_3$ . La reacción requiere de una elevada temperatura o un catalizador. El color es medido a 630 nm y es estable al menos 30 horas. El procedimiento, en líneas generales, sigue principalmente el método descrito por Grasshoff y Johansen (1973) (en Kremling y Wenk, 1986). El color azul del indofenol, sin embargo, es influenciado por la salinidad, lo cual debe ser compensado por la aplicación del factor de salinidad.

5.1.2.2.5. Determinación de Nitrito. El método es específico para los iones nitrito, y esta basado en la formación de un diazo altamente coloreado, el cual es medido colorimetricamente a 540 nm. El procedimiento aplicable a todo tipo de aguas marinas sigue el método de Grasshoff (1983) (en Kremling y Wenk, 1986). La reacción es altamente libre de interferencias ó compuestos

presentes normalmente en el océano o en aguas costeras. La salinidad no afecta la absorbancia significativamente.

5.1.2.2.6. Determinación de Nitrato. El método generalmente aplicado para la determinación de nitratos ( $\text{NO}_3$ ), esta basado en su reducción hasta nitrito, el cual es determinado colorimetricamente por la formación de un diazo. El método descrito aquí está basado en una reacción heterogénea con una columna de cadmio granulado con pequeños trozos de cobre y sigue el procedimiento de Grasshoff (1983) (en Kremling y Wenk, 1986). Ha generado alta confiabilidad y usos para trabajos en el mar y es ampliamente libre de interferencias en aguas costeras y oceánicas. El método determina la suma del nitrito y nitrato, por lo tanto, una determinación de nitritos debe hacerse por aparte y restarse a la concentración obtenida por este método.

5.2. Aislamiento y cultivo de las cepas de microalgas en laboratorio.

5.2.1. Esterilización del material.

El material de vidrio fue lavado con jabón Extran al 5 % y enjuagado con abundante agua de chorro y luego agua destilada desionizada; luego de que el material esta totalmente limpio y seco fue llevado a la estufa a temperatura de  $190\text{ }^\circ\text{C}$  durante dos horas para esterilizarlo.

5.2.2. Parámetros del cultivo.

Para el aislamiento y obtención del inóculo, los cultivos se mantuvieron en las siguientes condiciones:

Temperatura:  $22 - 24\text{ }^\circ\text{C}$ .

pH: 7 - 8.

Salinidad: 5 y 15 UPS.

Intensidad lumínica: 3.7 - 3.9 Klux.

Fotoperíodo: 12 horas luz : 12 horas de oscuridad (12:12 h).

La salinidad y la temperatura de los medios de cultivo se mantuvieron en dichos valores debido a que en el medio natural las especies a estudiar se encuentran en aguas de baja salinidad por la influencia de la desembocadura de los ríos.

### 5.2.3. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo deben proporcionar los requerimientos mínimos de la especie a cultivar, tales como agua, sales minerales (macro y micronutrientes), fuente de nitrógeno, pH adecuado y en algunos casos vitaminas y hormonas (González *et al.*, 1995).

5.2.3.1. Medio F/2. Es un medio enriquecido que es generalmente fortalecido cuando se le agregan nutrientes como nitrógeno, fósforo, hierro y otros (Tabla 3). Muchos medios enriquecidos y sintéticos han sido desarrollados para el cultivo de algas microscópicas planctónicas, que han crecido exitosamente en estos medios. El medio R Guillard f/2 es utilizado para el cultivo de un gran número de especies algales que crecen sin dificultad (Stein, 1973).

Los nutrientes y el agua son esterilizados en autoclave por separado, después del ajuste del pH a 7.4, sirve para aislar y mantener microalgas.

Tabla 3. Solución Básica de nutrientes para medio F/2.

MACRONUTRIENTES	MICRONUTRIENTES	VITAMINAS
NaNO <sub>3</sub> 75 mg	Na <sub>2</sub> EDTA 4.36 mg	Cianocobalamina (B12)0.5mg
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na.H <sub>2</sub> O 5 mg	Cl <sub>3</sub> Fe.6H <sub>2</sub> O 3.15 mg	Tiamina HCl (B1) 0.1 mg
SiO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> .9H <sub>2</sub> O 15-30 mg	SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O 0.01 mg	Biotina (Vit. H) 0.5 mg
El silicato es solo para las diatomeas	SO <sub>4</sub> Zn.7H <sub>2</sub> O 0.022 mg	
	Cl <sub>2</sub> Co.6H <sub>2</sub> O 0.01 mg	
	Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O 0.018 mg	

	MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.006 mg	
--	--	--

\* Cantidad en gramos por cada litro enriquecido.

### 5.2.3.2. Medio Algal ( Fábregas, *et a.* 1995).

Es un medio rico en nutrientes válido para la producción intensiva de microalgas; consta de dos soluciones (Tabla 4).

Tabla 4. Solución Básica de nutrientes para Medio Algal.

MACRONUTRIENTES	MICRONUTRIENTES
Nitrato potasico 90.81 g	Citrato ferrico 1.0 g
Fosfato monosodico 6.41 g	Cloruro de zinc 0.061 g
	Cloruro de manganeso 0.566 g
	Molibdato amonico 0.11 g
	Cloruro de cobalto 0.010 g
	Sulfato de cobre 0.010 g
	EDTA 0.9 g
	Tiamina 0.2 g
	Biotina (del 2%) 0.13 g
	Cianocobalamina (del 1%) 0.18 g

\*(composición por 100 g).

Se sugiere preparar por separado las dos soluciones concentradas.

\* Solución macronutrientes:

Disolver 37.12 g de la solución en 700 ml de agua

\* Solución de micronutrientes:

Disolver 2.5 g de la solución en 300 ml de agua, autoclavar (120 °C, 20 minutos) por separado y mezclar ambas soluciones cuando estén a temperatura ambiente; la mezcla debe quedar sin grumos y transparente. El medio fue guardado en nevera a 4 °C y en oscuridad.

Para preparar un litro de cultivo a 2mM de nitrógeno, se añade 2 ml a 998 ml de agua destilada o de mar; para prepararlo a 10 mM de nitrógeno, se agrega 4 ml a 996 ml de agua destilada o de mar.

#### 5.2.4. Técnicas de aislamiento

El aislamiento tiene como fin obtener una población de microalgas a partir de un solo individuo, es decir, clones; esto se puede realizar desde aguas naturales preferiblemente cuando se encuentra en el denominado bloom o florecimiento algal. El crecimiento de las algas, bajo una serie particular de condiciones ambientales en la naturaleza, no necesariamente significa que estas sean condiciones óptimas sin embargo, los primeros ensayos para aislar el alga se realizan con los parámetros que se encuentra en su medio natural, lo cual es un buen punto de comienzo (Leal, 1998).

5.2.4.1. Aislamiento por medio de capilares modificados y lavados sucesivos. Esta técnica se utiliza cuando el alga a aislar, es unicelular, tiene un tamaño mayor a 10  $\mu\text{m}$ , también para formas coloniales y filamentosas. La técnica se puede trabajar en vidrio de reloj, portaobjetos excavados, portaobjetos normales y cajas de petri; en nuestro caso se utilizaron cajas de petri y/o portaobjetos normales.

Utilizando elementos limpios y esterilizados, se colocaron de 2 a 3 gotas de medio de cultivo de forma lineal o circular; posteriormente, con una pipeta Pasteur o capilar modificada, se realizaron diluciones progresivas de la muestra, en las gotas del medio de cultivo. Esta técnica culmina con el traspaso de cada unidad algal a un tubo de ensayo que contiene medio de cultivo adecuado para su crecimiento (Gonzales, *et al.*, 1995) en este caso F/2 y Medio algal.

5.2.4.2. Aislamiento por dilución. Esta técnica se utiliza cuando el alga que se desea aislar esta en abundancia, y al mismo tiempo tiene un tamaño inferior a 10  $\mu\text{m}$ ; no se manipulan las unidades algales en forma individual como en el

método anterior. El principio básico es estimar la densidad poblacional en una muestra por medio del microscopio invertido y efectuar las diluciones necesarias para reducir la densidad a una o a pocas células.

Se toma un mililitro de la muestra original y se agrega a un tubo de ensayo que contiene 5 ml de medio de cultivo. Se homogeniza bien y luego se toma un mililitro el cual se agrega a un segundo tubo de ensayo que contiene 5 ml de medio de cultivo, se homogeniza bien, y así sucesivamente hasta completar de 4 a 5 tubos.

El método es sencillo pero laborioso y no permite conocer a priori que especie se va a aislar; casi siempre se aíslan las especies abundantes de la zona, por lo que puede ser práctico para aislar especies dominantes (González, *et al.*, 1995).

5.2.4.3. Aislamiento por rayado de agar. Esta técnica se utiliza cuando el alga a aislar tiene un diámetro de 10  $\mu\text{m}$  o menor a este; se prepararon cajas de petri con el medio de cultivo F/2 y Medio algal con agar en una cantidad de 7 g/L. Se sembró de 1 a 2 gotas de la muestra cerca de la periferia de la caja y con una asa nicrom estéril se rayó suavemente en zig-zag sobre la caja (González *et al.*, 1995). Las cajas fueron incubadas en las condiciones mencionadas en el capítulo 4.2.2.

Luego del crecimiento de las colonias se verificó la presencia de las especies al microscopio; si se encontraba la especie de interés se tomaba un poco de muestra y se repetía el proceso de rayado en una caja de petri con medio nuevo. Finalmente, se trasladó las unidades algales a medios líquidos.

#### 5.2.5. Recuento Celular.

El conteo de células se realizó con la cámara Sedgwick-Rafter ya que las células no necesitan tanto tiempo para su sedimentación en comparación con la cámara Utermohl; además permite evaluar las condiciones físicas (color, tamaño, posibles contaminaciones, etc.) del cultivo.

### 5.2.6. Ensayos.

En cuanto al manejo de las especies en laboratorio se realizaron pruebas a temperaturas y salinidades diferentes, según las encontradas en el medio natural (Vidal 1995); la temperatura se trabajó a 20, 24 y 37 °C y la salinidad a 0, 15 y 35 UPS. Así mismo se utilizaron dos medios de cultivo para siembra de las cepas el F/2 y el Medio Algal, cada tratamiento con tres replicas. En las tablas 5 y 6 se presenta el listado de ensayos realizados con *Cyclotella glomerata* y con *Nitzschia sp2*.

Tabla 5. Listado de ensayos con Medio algal (MA).

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	E7	E4	E1
15	E8	E5	E2
35	E9	E6	E3

Tabla 6. Listado de ensayos con F/2.

Salinidad (UPS) UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	E16	E13	E10
15	E17	E14	E11
35	E18	E15	E12

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas estadísticas de análisis de varianza y ANOVA para ver si se ajustaban a un crecimiento normal. El crecimiento de la población de las especies se calculó en términos de densidad absoluta (ind/ml), tasa instantánea de crecimiento (K), tiempo de duplicación y rendimiento relativo (r').

$$K = (\ln N_f - \ln N_0)/t$$

Nf= Número final de ind/ml.

$$r' = (N_f - N_0) / N_0 \times 100$$

No= Número inicial de ind/ml.

$$t = \ln 2 / K$$

t= Tiempo (días).

### 5.2.7. Descripción de las especies estudiadas.

Para el monitoreo de las especies de fitoplancton se realizaron 18 muestreos en la Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM) (Tabla 7) abarcando los periodos climáticos de invierno y verano.

Tabla 7. Fechas de los muestreos realizados en la CGSM.

Fecha	Código
Oct-19-99	O
Oct-25-99	O
Nov-19-99	N
Nov-22-99	N
Dic-10-99	D
Dic-15-99	D
Ene-14-00	E
Ene-19-00	E
Mar-14-00	M

Fecha	Código
Mar-29-00	M
Abr-08-00	A
Abr-27-00	A
May-09-00	MY
May-23-00	MY
Jun-13-00	J
Jun-27-00	J
Jul-11-00	JL
Jul-24-00	L



#### 5.2.7.1. Descripción de *Cyclotella glomerata*

Orden Centrales

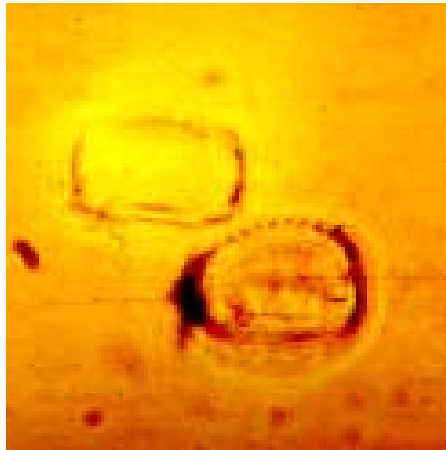
SubOrden Coscinodiscineae

Familia Thalassiosiracea

Genero *Cyclotella*

*Cyclotella glomerata*

Especie de aguas dulces, salobres, halófila, oligosaprobia se presenta en medios con altas concentraciones de fósforo pero en cambio necesita poco sílice; forma cadena, diámetro de 5-10  $\mu\text{m}$ . Presenta estrías marginales penetrando al centro en cantidad de 18 a 22 (Vidal, 1995) (Fotografía 1).



Fotografía 1. *Cyclotella glomerata* (40 X).

#### 5.2.7.2. Descripción de *Nitzschia sp2*.

Orden Pennales

Suborden Biraphidinea

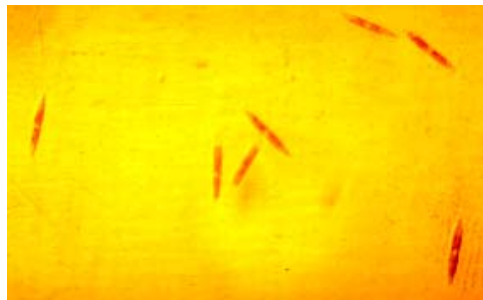
Familia Nitzschiaceae

Superfamilia Pseudonitzschia

Genero *Nitzschia*

*Nitzschia* sp2.

Especie de aguas dulce, salobres, cosmopolita. Largo 52  $\mu\text{m}$ , ancho 2  $\mu\text{m}$  y con 20 estrías; diámetro pequeño, menor de 3  $\mu\text{m}$ , esta dentro del grupo Pseudonitzschia, pertenece al complejo de *Nitzschia delicatissima* es delicadamente filiforme (Vidal, 1995) (Fotografía 2).



Fotografía 2. Vista de *Nitzschia* sp2 (25 X).

5.2.7.3. Descripción de *Oscillatoria* sp.

Clase Cianoficeae

Orden Hormogonales

Familia Oscillatoriacea

Genero *Oscillatoria*

*Oscillatoria sp.*

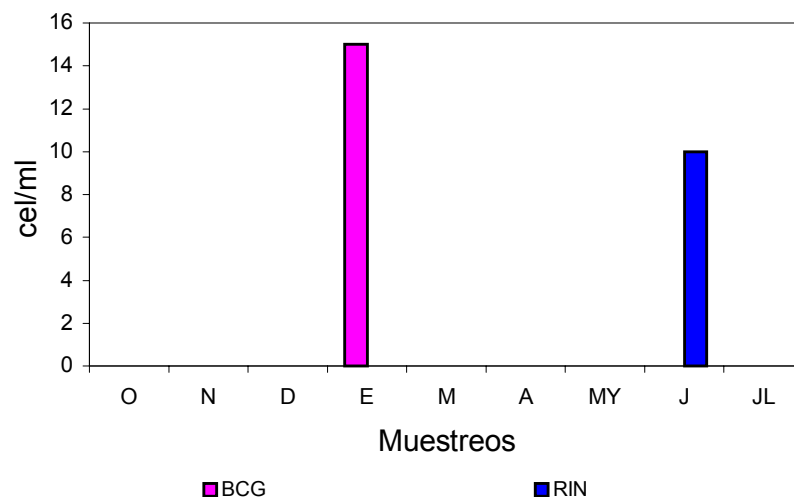
Cianofita filamentosa, se reproducen por hormogonios, los acinetos y heterocistos están ausentes. Presenta una vaina que recubre los tricomas, muy pequeña 2.5  $\mu\text{m}$  de ancho y delgada (Vidal 1995).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. *Cyclotella glomerata*.

#### 6.1.1. Monitoreo de la especie *C. glomerata* en el medio natural.

Durante el periodo de estudio la especie estuvo presente solo durante los meses de Enero y Junio del 2000 en las estaciones de Caño Grande y Rinconada con una abundancia de 15 cel/ml y 10 cel/ml respectivamente



(Figura 1).

Figura 1. Distribución y abundancia de *C. glomerata* (cel/ml) en la CGSM, entre Octubre de 1999 y Julio del 2000.

Debido a que la diatomea céntrica *C. glomerata* solo se presento en las estaciones Rinconada y Caño Grande no se pudo establecer relación frente a los parámetros fisicoquímicos tales como temperatura, salinidad, sílice y fósforo ya que la aparición de la especie aparentemente no tiene relación con las estaciones ni con las épocas climáticas ni con el aumento o disminución de las variables (Figura 2 y 3).

#### 6.1.2. Manejo en laboratorio.

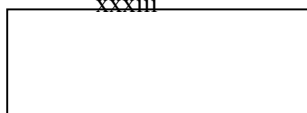
6.1.2.1. Pre-ensayo con diferentes medios de cultivo para el aislamiento de la especie *C. glomerata*.

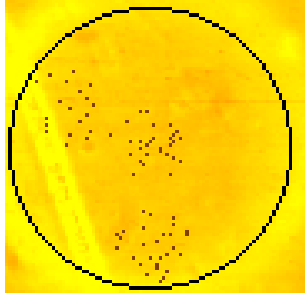
- Medio Algal. El crecimiento de *C. glomerata* en medio algal con adición de sílice, presenta un crecimiento lento tanto en medio líquido como en medio sólido donde se pudieron ver colonias formadas en las placas de agar. A la vez hubo crecimiento de otras especies de microalgas debido al medio de cultivo y la salinidad que permiten el rápido crecimiento de clorofitas y cianofitas cuya competencia por el sustrato es mayor que el de *C. glomerata*.

- Medio Porphyridium. Este medio de cultivo es recomendado por la Universidad de Texas ([www.bio.utexas.edu.com](http://www.bio.utexas.edu.com)) para el aislamiento y mantenimiento de cepas de esta especie en laboratorio, sin embargo ni en medio líquido ni en sólido hubo crecimiento.
- Medio F/2. El crecimiento de la especie fue lento pero se presentó crecimiento tanto en medio líquido como en sólido.

6.1.2.2. Aislamiento en condiciones de laboratorio de *C. glomerata*. La muestra fue tomada de la Ciénaga de la Luna en el mes de Octubre del 2000, el aislamiento por medio de capilares modificados y lavados sucesivos en medio líquido no dio buenos resultados con esta especie, debido a su pequeño tamaño y a su baja abundancia en las muestras naturales; así mismo el aislamiento por dilución tampoco favoreció la separación de la especie ya que al sacar el mililitro de muestra se llevaban un sin número de especies cuyo crecimiento fue mucho más rápido que el de *C. glomerata* provocando un descenso muy rápido de nutrientes que desfavorecía a la especie en cuestión y que por falta de ellos no crecía en los medios de cultivo.

La técnica de rayado de agar fue eficiente para aislar la especie, al cabo de dos meses crecieron colonias minúsculas en las cajas de petri; las colonias son de color café rojizo brillante, convexas de forma circular con algunas prolongaciones que salen de ellas; en medio líquido son de color café amarillo; en laboratorio no se observó





la formación de filamentos que en el medio natural se presentan tal como lo reporta

Vidal (1995) (Fotografía 3).

Fotografía 3. Colonias de *C. glomerata*.

### 6.1.3. Ensayos con *C. glomerata*.

La densidad celular inicial de *C. glomerata* para los ensayos fue de  $2 \times 10^5$  cel/ml; los cultivos duraron entre 10 y 12 días; al octavo día de cultivo se alcanzo la densidad máxima  $1.26 \times 10^6$  cel/ml a 20 °C en F/2 y 0 UPS; con el incremento de la temperatura la densidad máxima fue de  $1.05 \times 10^6$  cel/ml a 24 °C, alcanzada al día décimo y  $4.41 \times 10^5$  cel/ml a 37 °C que se obtuvo al segundo día de cultivo (Tabla 8).

Tabla 8. Densidad máxima (cel/ml) de los ensayos realizados en F/2 con *C. Glomerata*

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	$1.26 \times 10^6$	$1.05 \times 10^6$	$4.41 \times 10^5$
15	$9.75 \times 10^5$	$1.05 \times 10^6$	$5.58 \times 10^5$
35	$2.66 \times 10^5$	$2.00 \times 10^5$	$2.00 \times 10^5$

En Medio algal se obtuvieron densidades máximas de  $8.16 \times 10^5$  cel/ml a 20 °C al octavo día de cultivo,  $7.25 \times 10^5$  cel/ml para 24 °C al octavo día y  $4.05 \times 10^5$  cel/ml para 37 °C que se alcanzo al segundo día del cultivo, todas a 0 UPS

(Tabla 9.). Con respecto a la salinidad la mejor para el crecimiento de la cepa fue de 0 UPS seguida por 15 UPS y por último 35 UPS. El mejor medio de cultivo para el crecimiento fue F/2.

Tabla 9. Densidad máxima (cel/ml) de los ensayos realizados en medio algal (MA) con *C.glomerata*.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	8.16 x10 <sup>5</sup>	7.25 x10 <sup>5</sup>	4.05 x10 <sup>5</sup>
15	9.50 x10 <sup>5</sup>	8.75 x10 <sup>5</sup>	5.58 x10 <sup>5</sup>
35	2.08 x10 <sup>5</sup>	2.0 x10 <sup>5</sup>	2.05 x10 <sup>5</sup>

La temperatura influyó en la tasa instantánea de crecimiento, tiempo de duplicación y rendimiento relativo de los cultivos; el mejor rendimiento relativo (1167%) de los cultivos realizados con la cepa, se presentó a 0 UPS, temperatura de 20 °C y medio F/2 (Figura 4); seguido por 15 UPS donde hay un comportamiento muy similar entre las temperaturas de 20 y 24 °C y los medios de cultivo utilizados (Figura 5) y por último a 35 UPS en donde no hubo rendimiento ya que en la mayoría de los cultivos el crecimiento fue negativo (Figura 6).

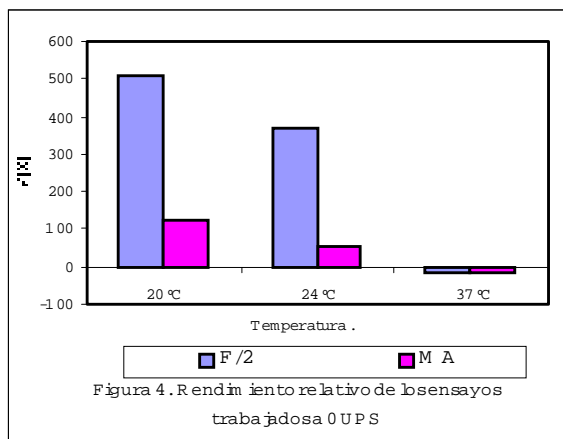


Figura 4. Rendimiento relativo de los ensayos trabajados a 0 UPS

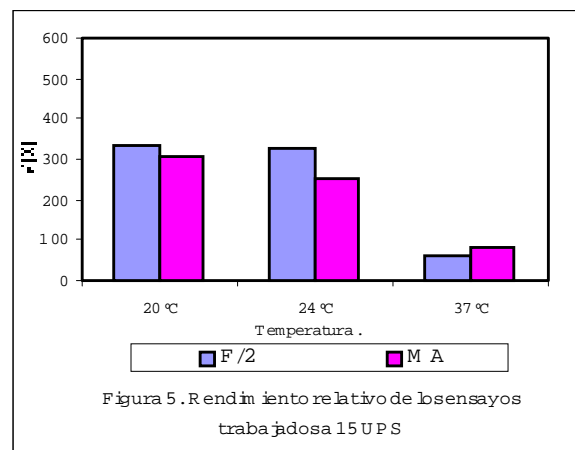
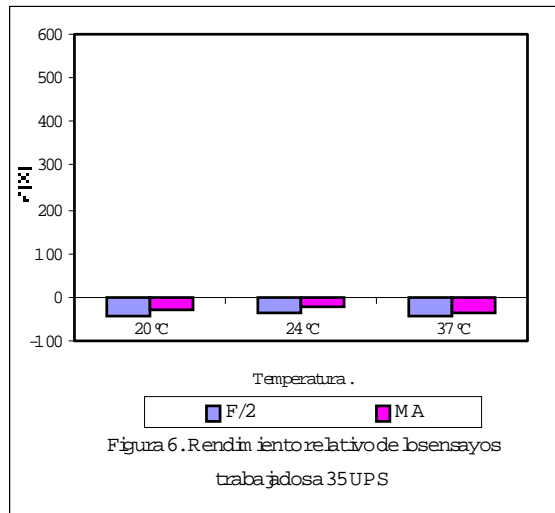


Figura 5. Rendimiento relativo de los ensayos trabajados a 15 UPS



La tasa instantánea de crecimiento de esta cepa se mantuvo entre 5.91 y 12.52, los valores mas altos de K se presentaron en F/2 (Tabla 10) y los mas bajos en Medio algal (Tabla 11), esto significa que el medio de cultivo afecta el crecimiento del alga y a medida que la temperatura incrementa el valor de K va disminuyendo, esto ocurre para los dos medios utilizados.

Tabla 10. Tasa instantánea de crecimiento para *C. glomerata* en F/2.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	12.4857	12.5255	5.9197
15	11.6476	12.1366	9.6135
35	9.6313	5.633	-----

Tabla 11. Tasa instantánea de crecimiento para *C. glomerata* en Medio algal.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	11.4721	11.01023	5.9197



15	11.5784	12.2495	10.7539
35	8.8085	-----	-----

El tiempo de duplicación (td) de la especie va desde 1 hora 32 minutos a 2 horas 95 minutos; el td indica cuanto tiempo (días) se tarda una célula en duplicarse, si las condiciones del medio son adversas el valor de la variable será alto y si son favorables será bajo por tanto el mejor td es 1 hora 32 minutos que se obtuvo en medio F/2 a 24 °C y 0 UPS, seguido por 1 hora 33 minutos que se produjo en F/2 a 20 °C y 0 UPS; el td más alto fue a 24 °C, 35 UPS en F/2 (Tablas 12 y 13).

Tabla 12. Tiempo de duplicación (horas) para *C. glomerata* en F/2.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	1.332	1.327	2.808
15	1.428	1.370	1.730
35	1.727	2.952	-----

Tabla 13. Tiempo de duplicación ( horas) para *C. glomerata* en Medio algal.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	1.4496	1.4975	2.808
15	1.4352	1.356	1.5456
35	1.886	-----	1.5816

El crecimiento de la especie esta determinado en gran medida por el medio de cultivo que permite que la especie y que el cultivo se mantenga por más días pese a que las otras variables sean adversas; este el caso de F/2 donde se

obtuvo mejor rendimiento que con el Medio algal, alcanzando mayor densidad celular y manteniéndose por más tiempo las células viables aunque no a una densidad celular alta. Por su parte la temperatura puede acelerar o disminuir la tasa de duplicación de la especie; en los cultivos realizados los mejores resultados se presentaron a 20 y 24 °C con  $R^2$  de 0.9579, 0.982 y 0.8625 entre otros (Figuras 7-15). Con relación a la salinidad se observa que en condiciones altas la densidad celular de los cultivos disminuye o en algunos casos se mantiene a través del cultivo con la densidad inicial de este.

Por lo tanto las condiciones óptimas para el mantenimiento y crecimiento del alga en laboratorio son temperatura de 24 °C, salinidad de 0 UPS y el medio de cultivo F/2.

## 6.2. *Nitzschia sp2*.

### 6.2.1. Monitoreo de la especie *Nitzschia sp2* en el medio natural.

Se efectuaron 18 muestreos entre los meses de octubre de 1999 y julio del 2000; durante este periodo la especie estuvo presente en todos los meses excepto en mayo, donde no se presentó en ninguna de las estaciones; su abundancia osciló entre 1.2 y 2.383 cel/ml (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución y abundancia de *Nitzschia sp2* (cel/ml) en la CGSM

	FECHAS DE MUESTREO								
	O	N	D		M	A	MY	J	JL
BRA	24	12	4	501	505	0	0	1.4	1.2
BCG	3622	872	73	130	100	313	0	1152.8	5.2
CEN	1082	68	233	1856	36	0	0	0	0
LBA	456	2548	162	0	76	391	0	2.5	7.6
RIN	0	461	235	415	79	15	0	3.2	3.1
BRS	34	143	4	795	334	93	0	0	8.6
BRF	137	18	0	72	1185	0	0	3.4	16.8

Aunque la especie estuvo presente la mayor parte del periodo de estudio su abundancia alcanza densidades altas durante el periodo de invierno en donde hay salinidades bajas entre los meses de Octubre a Marzo al parecer la especie esta relacionada con la salinidad de modo que en la época de verano con salinidades altas, entre los meses de Abril y Mayo, la especie disminuye su abundancia hasta desaparecer por completo en el mes de Mayo, posteriormente hay una etapa de transición entre los meses de Junio y Julio donde la especie aumenta paulatinamente su densidad celular (Figura 16 a-d).

Según Hernández (1988) las comunidades fitoplanctónicas están obligadas a una reorganización debido a las oscilaciones de la salinidad en la masas de agua con características físico químicas diferentes, siendo un factor condicionante que actúa sobre los procesos y la estructura del sistema, frena la sucesión, disminuye la diversidad de especies y afecta las estrategias de las especies como migraciones, distribución y reproducción. Con respecto a las

variables sílice, fósforo y otros nutrientes, en el marco del proyecto “ Dinámica de la comunidad fitoplanctonica en la CGSM durante su rehabilitación y verificación parcial de esta dinámica a través de bioensayos con *Actinocyclus normanni* Hustedt Bacillariophyceae en laboratorio” se estableció que estos no son factores determinantes para la ausencia o presencia de las especies de fitoplacton en la CGSM ya que luego de realizar pruebas estadísticas complejas como Diversidad de Hill, Similaridad de Bray Curtis y UPGMA se puso de manifestó un patrón de relaciones bastante laxas que esta de acuerdo con el bajo grado de estructura en general en el ecosistema lagunar; así mismo se manifestó una relación con tendencia positiva con la salinidad (Sánchez, et al 2001) (Figuras 17, 18 y 19).

#### 6.2.2. Manejo en laboratorio.

6.2.2.1. Pre-ensayo con diferentes medios de cultivo para el aislamiento de la especie *Nitzschia* sp2.

- Medio algal. Para *Nitzschia* sp. el medio fue excelente debido a que su crecimiento fue muy rápido tanto en medio líquido como en medio sólido y se contamina muy poco con otras especies.
- Medio F/2. El crecimiento de la especie en este sustrato fue bueno comparándolo con las otras especies pero su densidad celular fue mucho mayor con el Medio algal.

#### 6.2.2.2. Aislamiento de *Nitzschia sp2* en condiciones de laboratorio.

El aislamiento por medio de capilares modificados y lavados sucesivos para la diatomea *Nitzschia sp2*, no fue eficiente; al contrario el aislamiento por dilución fue un método efectivo ya que el crecimiento de la diatomea fue rápido, desplazo a otras especies que estaban en el medio; el mejor método para aislamiento fue rayado en agar, ya que con una pequeña gota del medio natural (CGSM) se formaron a los pocos días, varias colonias de la especie de modo que fue muy fácil separar la colonia y pasarla bien a medio liquido para su crecimiento o a placa de agar para repicar la cepa. Las colonias de esta especie son de color café oscuro, de contorno poco definido; las colonias consumieron y degradaron rápidamente el medio de cultivo. En medio liquido el color de las células es muy parecido al de *C. glomerata* café amarillo pero en este caso se forman grumos en el fondo del frasco (Fotografía 4).



Fotografía 4. Aislamiento de *Nitzschia sp2*.

#### 6.2.3. Ensayos con *Nitzschia sp2*.

Para la realización de los ensayos la densidad celular inicial de la diatomea fue de  $1 \times 10^5$  cel/ml. Los cultivos duraron entre 10 y 12 días alcanzando las densidades máximas entre los días octavo y décimo a temperatura de 37 °C; entre los días sexto y octavo a 24°C y en los días sexto y octavo nuevamente para 20 °C. La densidad de esta diatomea es mayor en medio algal a la temperatura de 37 °C ( $1.3 \times 10^6$  cel/ml), seguida por 24 °C ( $1.0 \times 10^6$  cel/ml) a 0 UPS; en F/2 la densidad máxima se presentó a 20 °C ( $9.41 \times 10^5$  cel/ml) a 0 UPS (Tabla 15 y 16).

Tabla 15. Densidades máximas de los ensayos realizados en F/2 con *Nitzschia sp2*.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	$9.41 \times 10^5$	$8.41 \times 10^5$	$9.25 \times 10^5$
15	$4.75 \times 10^5$	$4.25 \times 10^5$	$4.25 \times 10^5$
35	$1.5 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$

Tabla 16. Densidades máximas de los ensayos realizados en medio algal (MA) con *Nitzschia sp2*

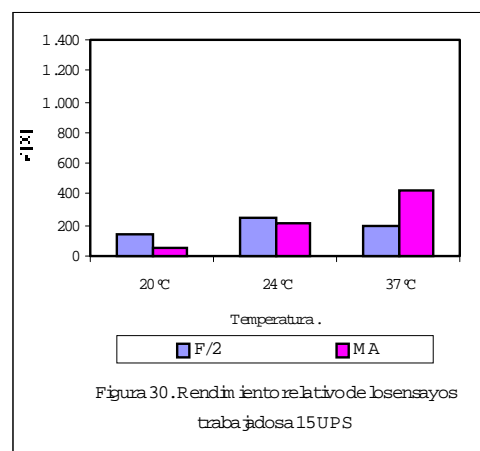
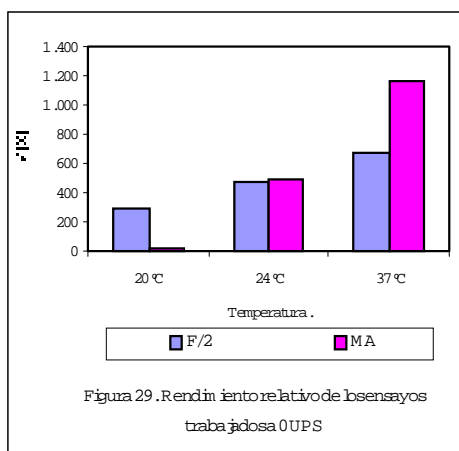
Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	$4.66 \times 10^5$	$1.02 \times 10^6$	$1.35 \times 10^6$
15	$3.58 \times 10^5$	$4.91 \times 10^5$	$6.58 \times 10^5$
35	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$

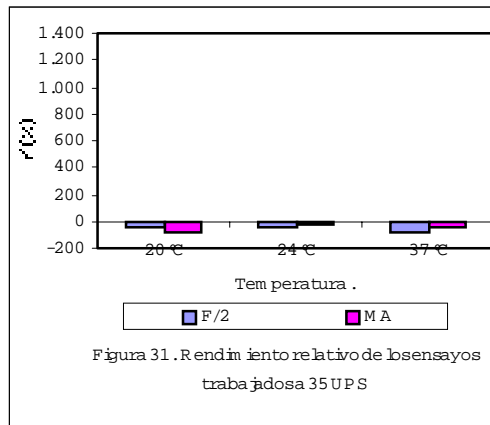
Se observa que la especie soporta cambios de salinidad en su medio, pero su crecimiento se ve afectado en condiciones extremas como son 20 °C, 35 UPS y F/2; la densidad decrece rápidamente obteniendo  $R^2$  de 0.455 siendo el más bajo de todos los tratamientos. Esta respuesta negativa no solo se presenta a

esta temperatura, si no en todos los tratamientos sometidos a la salinidad de 35 UPS .

Para esta diatomea la temperatura y la salinidad son determinantes para su densidad celular y por consiguiente determina la presencia de la especie en la masa de agua; la densidad máxima ( $1.35 \times 10^6$  cel/ml) se encuentran a 37 °C y 0 UPS y Medio algal (Figura 20-28.), seguida por  $1.025 \times 10^6$  cel/ml que se presento a 24 °C, 0 UPS y Medio algal. La especie soporta cambios de salinidad en su medio pero su crecimiento se ve afectado esto se aprecia en las figuras 26-28.

La salinidad fue un factor determinante, que influyó en la densidad celular de los cultivos; esto se demostró mas claramente al realizar el rendimiento relativo para cada tratamiento, dando como resultado que los mejores rendimientos se obtuvieron a 0 seguido por 15 y 35 UPS. El mayor rendimiento se obtuvo en el ensayo realizado a 37 °C, 0 UPS y Medio algal con un valor de 1167 % , seguido por 667 % a las mismas condiciones pero con F/2 (Figuras 29-31).





De la misma manera se observa que el tiempo de duplicación de las microalgas se ve afectado por la salinidad y por el medio de cultivo; estos valores varían desde 1.3188 para el cultivo que se trabajó a 37 °C, 0 UPS y Medio algal a 3.8064 horas para el cultivo que se trabajó a 37 °C, 35 UPS y F/2 (Tablas 17 y 18).

Tabla 17. Tiempo de duplicación (horas) de *Nitzschia sp2*. en F/2.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	1.48032	1.40592	1.3188
15	1.5597	1.5148	1.3584
35	1.8693	3.1900	3.8064

Tabla 18. Tiempo de duplicación (horas) de *Nitzschia sp2*. en Medio algal.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	1.5304	1.4628	1.3188
15	1.5196	1.5480	1.3584
35	2.0260	1.7328	1.8688



La tasa instantánea de crecimiento igual que en el tiempo de duplicación (td) y en el rendimiento relativo (r') es mejor para el tratamiento de 37 °C, 0UPS y medio algal con un valor de 12.6126, seguido por el tratamiento que se trabajo a iguales condiciones con la variación de medio de cultivo F/2 con un valor de 12.5862 y el valor mas bajo de K se obtuvo en el tratamiento a 37°C, 35 UPS y F/2 con un valor de 4.3701 (Tablas 19 y 20).

Tabla 19. Tasa instantánea de crecimiento de *Nitzschia sp2*. en F/2.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	11.2360	11.8316	12.5862
15	10.6639	10.9803	11.1436
35	8.900	5.2117	4.3701

Tabla 20. Tasa instantánea de crecimiento de *Nitzschia sp2*. en Medio algal.

Salinidad UPS	Temperatura °C		
	20	24	37
0	10.8694	11.3715	12.6126
15	10.9555	10.7462	12.2456
35	8.2078	9.5941	8.900

El efecto más negativo para la cepa de *Nitzschia sp2* se presenta en condiciones de temperatura 20 °C, salinidad de 35 UPS y medio de cultivo F/2; mientras que las condiciones más favorables para el mantenimiento y crecimiento de la especie en laboratorio son temperatura de 37 °C, salinidad de 0 UPS y medio de cultivo Medio Algal.

### 6.3. *Oscillatoria sp.*

#### 6.3.1. Monitoreo de la especie en el medio natural.

Durante los meses de Octubre de 1999 a Abril del 2000, la especie presento densidades que oscilaron entre 27 y 351.708 filamentos/ml; en Junio y Julio del 2000 la especie solo se presento en la estación Boca de la Barra con densidad de 2.4 y 2.5 filamentos/ml, siendo los valores más bajos durante todo el periodo de muestreo (Tabla 21.).

Tabla 21. Distribución y abundancia (filamentos/ml) de *Oscillatoria sp.* en la CGSM.

Estación	Epócas de muestreo								
	O	N	D	E	M	A	MY	J	JL
BRA	0	0	0	0	99824	203676	0	0	0
BCG	29684	0	0	0	67545	358800	0	0	0
CEN	0	0	0	35123	150577	179011	0	0	0
LBA	0	30193	0	0	0	0	0	5.9	2.4
RIN	27	7482	0	0	24557	62047	0	0	0
BRS	0	0	0	0	44328	324808	0	0	0
BRF	0	0	0	0	68309	11542	0	0	0

La cianobacteria *Oscillatoria sp.* fue muy abundante en los meses de marzo y abril en donde se presentan salinidades medias ya que es un periodo donde se esta terminando el invierno y esta empezando el verano en la CGSM (Hernandez, 1986) es decir una época de transición en donde hay gran cantidad de nutrientes en el agua por influencia de los ríos que desbocan en la CGSM. La especie disminuye su presencia en la masa de agua durante los

meses de diciembre, mayo, junio y julio en donde se presentan salinidades muy bajas por el invierno (Figura 32 a-d).

Los nutrientes sílice y fósforo varían mucho por la entrada de las aguas provenientes de los ríos que desembocan en la Ciénaga los cuales pueden de una u otra manera agregar nutrientes al medio (Figuras 32 a y 32 b).

El comportamiento de la cianofita durante el periodo de muestreo con respecto a las variables salinidad y temperatura se observa en la figura 25; la especie se presenta con regularidad durante los meses de Enero a Mayo en todas las estaciones con excepción de Boca de la Barra y Centro en las cuales la salinidad sobrepasó los 15 UPS; al igual que con las otras especie del fitoplancton no se presenta relación con los nutrientes sílice y fósforo como se describe en el capítulo 6.2.2. (Figuras 33 - 35)

### 6.3.2. Manejo en laboratorio.

6.3.2.1. Pre-ensayo con diferentes medios de cultivo para el aislamiento de la especie *Oscillatoria sp.*

- Medio Algal: Para *Oscillatoria sp.* se trabajo con el Medio Algal normal y dio buenos resultados, se adaptó muy bien tanto a medio líquido como en medio sólido.

- Medio F/2. El crecimiento de esta alga en el medio fue lento algo poco normal en este tipo de algas ya que por su caracterización cosmopolitas suele crecer rápidamente en diferentes medios o sustratos; pero creció bien tanto en medio sólido como en medio líquido.

#### 6.3.2.2. Aislamiento de *Oscillatoria sp.* en condiciones de laboratorio.

**Los métodos de aislamiento por medio de capilares modificados y lavados sucesivos para esta especie no fueron efectivos ya que esta alga es muy pequeña y se pierde entre la muestra original y la gota de medio de cultivo nuevo, o posiblemente se quedaba en el portaobjetos con facilidad teniendo como consecuencia un bajo número de algas aisladas.**

**En el método de aislamiento por dilución en la cianofita respondió mejor ya que en la mayoría de los casos la especie fue muy abundante en la muestra, de manera que las diluciones lograron separarla del resto de algas, sin embargo el crecimiento de la especie *Oscillatoria sp.* no fue bueno en medio líquido en los cultivos probados debido a que se formaron conglomerados muy difíciles de deshacer. El método de aislamiento por rayado de agar fue el mejor ya que se formaron colonias grandes y diferenciables del resto de colonias permitiendo su separación. Las colonias de esta especie son de color verde esmeralda y de forma muy irregular, además se introducen en el agar.**

### 6.3.3. Ensayos con *Oscillatoria sp.*

No se realizaron pruebas adicionales con la cepa por cuando los inóculos tardaron mucho tiempo en crecer y al final de la fase experimental del proyecto se contaminaron con una microalga de este mismo grupo pero cocoides de 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, de similares características a la reportada por Vidal y Galan, 1999.

## 7. CONCLUSIONES

La abundancia de *Oscillatoria sp* en la CGSM fue registrada en términos generales en los meses de octubre de 1999 a Abril del 2000 con valores bastante altos durante los meses Marzo y Abril; *Nizschia sp2* se presentó durante gran parte del periodo de muestreo más valores altos de densidad celular, pero no tanto como los de *Oscillatoria sp.*; *Cyclotella glomerata* solo se encontró en las estaciones de Rinconada y Caño Grande con valores de 10 y 15 cel/ml respectivamente.

Las especies *Oscillatoria sp* y *Nizschia sp2* fueron tolerantes a cambios bruscos de los factores fisicoquímicos especialmente de salinidad, de modo que durante marzo y abril estas especies pese al aumento de la salinidad estuvieron presentes en la CGSM; *C. glomerata* es una especie puntual que aparentemente necesita requerimientos fisicoquímicos específicos para su crecimiento.

La presencia y abundancia de *Oscillatoria sp.*, *Nizschia sp2* y *Cyclotella glomerata* en la CGSM esta determinada parcialmente por la salinidad; no se encontraron relaciones entre la ausencia o presencia de las especies, con relación a las variables sílice, fósforo y temperatura.

El método de aislamiento de rayado en placas de agar fue el más efectivo para la separación de estas especies en laboratorio ya que es un método fácil de realizar y en el cual se obtienen resultados positivos rápidamente.

Las condiciones óptimas para el mantenimiento y crecimiento de *C. glomerata* en laboratorio fueron temperatura 24°C, salinidad 0 UPS y el medio de cultivo F/2; las condiciones menos favorables para su crecimiento fueron temperatura 37 °C, salinidad 35 UPS y Medio Algal.

El efecto más negativo para la cepa de *Nitzschia sp2* se presentó en condiciones de temperatura 20°C, salinidad de 35 UPS y medio de cultivo F/2; las condiciones más favorables para el mantenimiento y crecimiento de la especie en laboratorio fueron temperatura 37 °C, salinidad 0 UPS y medio de cultivo Medio Algal.

Con *Oscillatoria sp.* no se realizaron pruebas adicionales como las que se realizaron con las otras dos especies en estudio, por cuando los inóculos tardaron mucho tiempo en crecer y al final de la fase experimental se contaminaron con una microalga de este mismo grupo pero cocoides de 1.5 µm de diámetro.

## 8. RECOMENDACIONES

Continuar con investigaciones de tipo fisiocológico de las cepas que se lograron aislar en el laboratorio durante este trabajo.

Realizar los ensayos con la Cianofita *Oscillatoria sp* ya que con estas características se puede mantener mejor la especie en el laboratorio para futuras investigaciones considerando que esta especie fue durante el periodo de estudio la más abundante en la CGSM y tiene gran importancia ecológica.

Continuar con el aislamiento de otras especies que se encuentran en la CGSM para conformar un cepario del cual se pueden derivar varios estudios y hasta la exportación de las cepas a distintos lugares para su manipulación en laboratorio.



## BIBLIOGRAFIA

Botero, L. 1995 Informe sobre la mortandad masiva de peces ocurrida en el complejo lagunar Ciénaga Grande de Santa Marta Caribe Colombiano, en junio de 1995. Informe Programa Lagunas Costeras. INVEMAR. Vp.

-----; J.E. Mancera-Pineda; L.A. Vidal; A. Santos-Martinez; G. Ramírez; M.L. Fontalvo; L.F. Espinosa; W. Troncoso; E.Vilora; J.G.Salazar. 1995. Informe sobre la mortandad masiva de peces ocurrida en el complejo lagunar CGSM, Caribe Colombiano, Junio 1995. INVEMAR, Santa Marta. 13p.

-----; L., Mancera, E. 1996. Sintesis de los cambios de origen antropico ocurridos en los ultimos 40 años en la Cienaga Grande de Santa Marta (colombia). Rev. Acad. Colom. Cienc. 20:465-474.

Bricter, E. y Stevenson, N. 1996. Lake ontavio food web, and energetic mass balance. En: Trophic models of aquatic ecosystems. Makati, Metro Monila. 29 –39 p.

Esminger, D. 1997. Productivity studies on diatom cultures. En: Cultivation of marine organisms and its importance for marine biology. Koenigstein. 97 – 103 p.

Fabregas, J; Morales , E; T. Lamela.; Cabezas, B y A. Otero. 1997. Short communication mixotrophic productivity of the marine diatom *Phaedactylum tricornutum* with soluble fractions of rye, wheat and potato. World journal of Microbiology & Biotecnology. 13: 349-351 p.

Gonzalez, M. 1991. Biomasa del fitoplancton y contenido del seston en un estuario de manglar (Ciénaga Grande de Santa Marta). Valdivia. 262p.

Gonzalez, M.; Parra, O.; y Cifuentes, A. 1995. Tecnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: Manual de metodos ficológicos. Universidad de Concepcion. Chile: Editora Anibal Pinto, 220-249 p.

Gomina L., J.E. Mancera y L. Botero. 1998. Aplicación de imágenes de satélite al diagnostico ambiental de un complejo lagunar estuarino tropical: Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe Colombiano. INVEMAR serie de publicaciones especiales No. 4. Santa Marta, 56 p.

Haskin, H. H. A. 1987. Spectrophotometric method for the analysis of chloroplast pigments. J. Biol. Chem. 144p.

Hernandez. C. 1988. Producción primaria del fitoplancton en la Ciénaga Grande de Santa Marta. Trabajo de grado para optar al titulo de Biólogo Marino. Universidad Jorge Tadeo Lozano. 103 p.

Hernández, C.A. y K. Goke. 1989. Productividad primaria en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. En: An. Inst. Invest. Mar. Punta Betín. Santa Marta. 19-20:101-119.

Instituto Geográfico Agustín Codazzi (Igac). 1973. Monografía del departamento del Magdalena. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá. 163 p.

Jordan, W.R.; Gopin, M.E.; Aber, J.D (eds). 1987. Restoration Ecology. Cambridge University Press. Cambridge. 15 – 25 pp.

Kremling, K.; Wenk, A. 1986. Métodos químicos para usar en el monitoreo de ambientes marinos. Institut for meereskunde. Dusterbrooker weyzo. Vp.

Leal E.F. 1996. Efectos de algunos factores ambientales sobre la capacidad carotenogénica de una cepa de *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales). Tesis de posgrado universidad del Oriente (trabajo especial de grado, MCS). Inst. Ocean. De Venezuela, Uni de Oriente, Cumaná, Venezuela. 145 p.

-----, 1998. Manual de cultivo para microalgas. Universidad del Atlántico. 117p.

Mancera , J.E. y L.A. Vidal, 1994. Florecimiento de microalgas relacionado con mortandad masiva de peces en el complejo lagunar Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe Colombiano. An. Inst. Invest. Mar. Punta Betín, 23:103-119.

-----, J.E. 1995. Hacia un ordenamiento pesquero de la CGSM. En: Estudio ecológico de la Ciénaga Grande de Santa Marta – Delta exterior del Río Magdalena 3ª etapa. INVEMAR. Santa Marta. Vol. 1. 200p.

-----, J.E. (Ed), 1997. Proyecto monitoreo del efecto ambiental de la construcción de canales en el delta exterior del Río Magdalena. 91 p.

Márquez. G. 1982. Estudios ecológicos de la producción primaria de algas y comunidades benticas vegetales de la región de Santa Marta, Caribe Colombiano. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. 59 p.

Murphy, H. y Riley, G. 1962. The food web sea. En: Oceanography: the last frontier. Richard C. Vetter. Washington, D.C. 307 –321p.

Nixon, 1982. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes and future concerns. Ophelia 41:199-219.

Norstog, J. y Long, L. 1976. Sedimentary patterns and processes in west coast lagoons. En: Estuarine processes. New York. Academic Press. Vol. 2. 167 – 181p.

Paniagua J.; F. Bucle; C. Granados y D. Salinas. 1986. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Baja California, México: CICESE. 92 p.

Perdomo, L. 1998 Influencia en la entrada de agua dulce en la regeneración del manglar en la región de la Ciénaga Grande de Santa Marta. Corporación Autónoma Regional del Magdalena CORPAMAG. Ser. Doc. Tec. (6):49-65 p.

PRO-CIENAGA. 1994. Estudio de impacto ambiental. Proyecto de cooperación técnica Colombo - Alemán para la rehabilitación de la Ciénaga Grande de Santa Marta. Santa Marta. 382 p.

Roldán, G. 1989. Fundamentos de limnología neotropical. Universidad de Antioquia. Medellín. 529p.

Sánchez. R. 1998. Metabolismo del nitrógeno y fósforo en la columna de agua y su relación con la producción fitoplanctónica en la laguna costera tropical Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe Colombiano. Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo. Universidad Nacional de Colombia. 98 p.

Sánchez, G. 2000. Aislamiento y cultivo de microalgas provenientes del Embalse del Guájaro (Caribe colombiano). Tesis Especialización Acuicultura. Universidad del Magdalena. Santa Marta. 96 p.

Sanchez, G.; Morales, E.; Guillot, G. y Vidal, L.A. 2001. Dinámica de la comunidad fitoplanctónica en la Ciénaga Grande de Santa Marta durante su rehabilitación y verificación parcial de esta dinámica a través de bioensayos con *Actinocyclus normanii* Hustedt (Bacillariophyceae) en laboratorio. Informe técnico final. COLCIENCIAS – INVEMAR. Santa Marta. 526p.

Stadler, J.; Di toro, D.; Toman, D. y Robert, V. 1988. Phytoplankton models and eutrophication problems. En: Ecological modeling. Washington, D.C. Resources for the future. 149 – 209p.

Stein, R. 1973. Metodos fisiologicos, medios de cultivos. McGraw – Hill. 234p.

Tilman, D. 1996. The benefits of natural disasters. *Science* 273:1518-1519.

UNESCO. 1966. International marine science. Environment and development in coastal regions and small islands. Gail Archibald. Paris. 33p.

Vidal, L.A. 1987. Dinamica de la estructura de la comunidad del fitoplancton en un sistema laguna – estuario tropical (CGSM) año 1987. Santa Marta. INVEMAR. 64p.

Vidal, L.A. 1995. Estudio del fitoplancton en el sistema lagunar estuarino tropical Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia, durante el año 1987. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 207 p.

-----; Galan, A. 1999. Bioensayos con *Actinocyclus normanii* (Bacillariophyta) para determinar condiciones de su mantenimiento en laboratorio. Preproyecto COLCIENCIAS – INVEMAR. Programa de calidad ambiental. 85p.

Wiedemann, H.U. 1973. Reconnaissance of the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia: Physical parameters and Geological history. En: Mitt. Inst. Colombo-Alemán Invest. Cient. Santa Marta, INVEMAR. 7:85-119p.

Witsch, H. Von. 1987. Wachstum and vitamin B1 gehalt von süsswasseralgen vershiedenen aussenbedingungen. *Naturwissenschaften*. 33p.

Yacubson. S. 1976. Las algas potencial biológico de las aguas. Publicaciones de la comisión organizadora de la III conferencia de las naciones unidas sobre derecho del mar. Caracas. 13pp.

