



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

EVALUACIÓN DE CIANOBACTERIAS EN EL LAGO EUTRÓFICO
YAHUARCOCHA POR MEDIO DE ESTUDIO DE SECUENCIAS DE ADN

TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

AUTORES:

Vanzety Ismael Guevara Báez
Alexis Roberto Morales Carrera

DIRECTORA:

Ing. Elizabeth Velarde MSc.

Ibarra, 2022



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
Acreditada Resolución N°. 173-SE-33-CACES-2020
Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales
Carrera Recursos Naturales Renovables

**CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Ibarra, 6 de diciembre de 2022.

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE CIANOBACTERIAS EN EL LAGO EUTRÓFICO YAHUARCOCHA POR MEDIO DE ESTUDIO DE SECUENCIAS DE ADN”**, de autoría del señor ALEXIS ROBERTO MORALES CARRERA estudiante de la Carrera de **INGENIERÍA RECURSOS NATURALES RENOVABLES** el tribunal tutor **CERTIFICAMOS** que los autores han procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

MSc. Elizabeth Velarde
DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN

FIRMA

MSc. Pedro Barba
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

MSc. Tania Oña
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
Acreditada Resolución N°. 173-SE-33-CACES-2020
Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales
Carrera Recursos Naturales Renovables

**CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Ibarra, 6 de diciembre de 2022.

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: “EVALUACIÓN DE CIANOBACTERIAS EN EL LAGO EUTRÓFICO YAHUARCOCHA POR MEDIO DE ESTUDIO DE SECUENCIAS DE ADN”, de autoría del señor VANZETY ISMAEL GUEVARA BÁEZ estudiante de la Carrera de **INGENIERÍA RECURSOS NATURALES RENOVABLES** el tribunal tutor **CERTIFICAMOS** que los autores han procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

MSc. Elizabeth Velarde
DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN

FIRMA

MSc. Pedro Barba
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

MSc. Tania Oña
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TRITULACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1004378905		
APELLIDOS Y NOMBRES:	MORALES CARRERA ALEXIS ROBERTO		
DIRECCIÓN:	AV. 17 de Julio 2-196		
EMAIL:	armoralesc@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	260-4681	TELÉFONO MÓVIL:	0998256146

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1004164586		
APELLIDOS Y NOMBRES:	GUEVARA BAEZ VANZETY ISMAEL		
DIRECCIÓN:	12 de Febrero y Bolívar		
EMAIL:	viguevarab@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	2910021	TELÉFONO MÓVIL:	0982206335

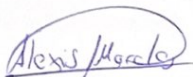
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE CIANOBACTERIAS EN EL LAGO EUTRÓFICO YAHUARCOCHA POR MEDIO DE ESTUDIO DE SECUENCIAS DE ADN
AUTOR (ES):	Alexis Roberto Morales Carrera Vanzety Ismael Guevara Báez
FECHA: DD/MM/AAAA	06/12/2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero en Recursos Naturales Renovables
ASESOR /DIRECTOR:	Msc Elizabeth Velarde

2. CONSTANCIAS

Los autores manifiestan que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que son los titulares de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

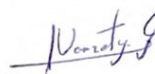
Ibarra, a los 06 días del mes de diciembre de 2022

LOS AUTORES:



ALEXIS ROBERTO MORALES CARRERA

Ci. 1004378905



VANZETY ISMAEL GEVARA BAEZ

Ci. 1004164586

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, por haberme brindado la oportunidad de realizar este gran proyecto de investigación y de hacer uso de sus instalaciones de igual manera al proyecto VLIR-UOS.

También a todos los docentes que fueron parte de nuestra formación académica, en especial a nuestra directora de tesis la MSc Elizabeth Velarde, que nos ha guiado en los conocimientos y ha dedicado tiempo a este importante trabajo, al igual que nuestros asesores MSc Pedro Barba y MSc Tania Oña.

Al igual a los docentes de la carrera de Recursos Naturales Renovables por su gran apoyo en especial:

Blgo. Renato Oquendo por su constante apoyo y mantener una actitud positiva.

MSc Ima Sánchez por su bondad y apoyo a la hora de instruirnos.

MSc Gabriel Jácome, MSc James Rodríguez y MSc Santiago Salazar por gran apoyo constante en lo académico a lo largo de nuestra formación académica.

Al equipo técnico de LABINAM: Ing. Karen Portilla por su apoyo y enseñanzas en los laboratorios

Ing. Jonathan Cordovillo por su constante apoyo y paciencia durante el transcurso de toda la investigación

A nuestros grandes amigos que nos acompañaron durante todo este viaje: Omar, Nathaly, Grace, Iván, Carlos y Stalin. a ustedes les agradezco por compartir su tiempo, sus experiencias, conocimientos, risas y su gran ayuda a través de estos años en la universidad.

Gracias

Alexis Y Vanzety

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada a Dios que siempre encontré fortaleza, fe y entusiasmo para realizar este trabajo, brindándome la sabiduría y poniendo en mi camino los recursos necesarios para terminar este importante trabajo.

A mis padres Pablo y Rocío, quienes me guiaron siempre con perseverancia y esfuerzo y paciencia, con sus consejos y su ejemplo me han demostrado se puede alcanzar los sueños y metas y lo más importante que el nunca rendirse siempre trae sus recompensas.

A mi abuelito Oswaldo, que siempre estuvo presente, brindándome su apoyo, enseñándome que la vida puede existir obstáculos pero con perseverancia se puede cumplir los objetivos propuestos, por cada consejo y más importante su amor incondicional y fe en mí.

A mis hermanas Paula y Daniela, por todas sus ocurrencias y amor de hermanos que siempre tenemos, por cada palabra de aliento y por ser las personas me han motivado a seguir adelante y sobre todo por ser un ejemplo de perseverancia

Inquebrantable.

A mis grandes amigos Omar Román, Vanzety Guevara, Grace Moreno, Nathaly Calderón, Stalin Fierro por estar siempre a mi lado y acabar siendo como mis hermanos, por todas las experiencias, aventuras, viajes y risas que vivimos juntos.

~ Alexis

DEDICATORIA

*El presente trabajo está dedicado a Dios donde siempre se puede con una guía,
paz y fe para siempre encontrar el camino*

*De la misma forma a mis padres Jorge y Anita quienes siempre han sido mi
mayor fortaleza, mis guías y quienes siempre han creído en mí y me han dado la
fuerza para cruzar este arduo camino en la universidad y en la vida para lograr
todas las metas propuestas.*

*A mis abuelitos Cecilia, Marco, Aníbal y Piedad quienes siempre están presentes
y siempre me apoyaron en mi camino.*

*También a mi hermana Irina que siempre ha buscado el bien para mí,
aconsejándome y dándome su apoyo tanto en momentos de felicidad como en
momentos difíciles y dándome un poco de su carácter que tanto me ha ayudado.*

*A mis mejores amigos de la universidad Alexis, Omar, Christian, Grace que
siempre me apoyaron para mejorar en este camino, con sus enseñanzas, charlas,
ayudas, ocurrencias, risas y viajes, les agradezco por formar parte de este viaje.*

~ Vanzety

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1. Revisión de Antecedentes	1
1.2. Problema de Investigación y Justificación	3
1.3. Pregunta Directriz de la Investigación	5
1.3.1. Objetivos	5
1.3.1.1. Objetivo general.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	7
2.1. Dinámica de los Lagos de Alta Montaña de Ecuador	7
2.2. Biovolumen Fitoplanctónico	8
2.3. Cianobacterias de lagos andinos	9
2.4. Cianotoxinas en cianobacterias	10
2.5. Secuencias de ADN para cianobacterias.....	10
2.6. Caracterización molecular de cianobacterias	11
2.7. Marco Legal	11
CAPÍTULO III METODOLOGÍA	14
3.1. Descripción del Área de Estudio.....	14
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Identificación de la riqueza de especies de Cianobacterias existente en el lago Yahuarcocha.	15
3.2.2. Evaluación de Calidad de Agua en Base a las Cianobacterias	20
3.2.3. Estrategias de manejo y control, como medida de mitigación.	22

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Identificación molecular de las Especies de Cianobacterias.....	24
4.1.1. <i>Análisis multitemporal de especies de cianobacterias</i>	27
4.2. Relación de la Calidad de Agua y la Presencia de Cianobacterias	27
4.2.1. Biovolumen de <i>Planktothrix</i> sp.	29
4.2.2. Biovolumen de <i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	30
4.2.3. Biovolumen de <i>Arthronema gygaxiana</i>	31
4.2.4. Biovolumen Fitoplanctónico.....	31
4.2.5. Diseño del Protocolo para evaluar el riesgo en Yahuarcocha	
4.3. Estrategias de Control de Cianobacterias.....	35
4.3.1. Proyecto de Monitoreo.....	35
4.3.2. Proyecto de educación ambiental	39
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
5.1. CONCLUSIONES	46
5.2. RECOMENDACIONES	46
REFERENCIAS	48
ANEXOS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del área del lago Yahuarcocha	14
Figura 2. Muestreo del lago Yahuarcocha (A) Botella de Van-Dorn (B) toma de muestras	17
Figura 3. Proceso de identificación de las especies presentes en microscopia lente 40x	17
Figura 4. Especies de cianobacterias: (A) <i>Planktothrix</i> sp. (B) <i>Cryptochroococcus tibeticus</i> (C) <i>Arthronema gygaxiana</i>	26
Figura 5. Análisis multitemporal de especies de cianobacterias de Yahuarcocha.....	27
Figura 6. Relación de la concentración de clorofila y el biovolumen.....	30
Figura 7. Relación del número de células por mililitro y el tamaño celular	31
Figura 8. Biovolumen para las estaciones de muestreo y columna de agua	33
Figura 9. Puntos de muestreo para monitoreo de cianobacterias	36
Figura 10. Estructura de fichas técnicas.....	40
Figura 11. Ficha visual para la especie <i>Planktothrix</i> sp.....	42
Figura 12. Ficha visual para la especie <i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	43
Figura 13. Ficha visual para la especie <i>Arthronema gygaxiana</i>	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de muestreo del lago Yahuarcocha.....	16
Tabla 2. Cebadores moleculares para cianobacterias.....	20
Tabla 3. Diseño de matriz de actividades.....	21
Tabla 4. Especies analizadas por secuencias.....	24
Tabla 5. Concentración de ADN.....	25
Tabla 6. Datos en base a muestreos de biovolumen.....	28
Tabla 7. Especies potencialmente tóxicas y sus posibles toxinas	29
Tabla 8. Estadística descriptiva tabla resumen de biovolumen.....	32
Tabla 9. Protocolo para evaluar ecosistemas acuáticos y su nivel de riesgo por biomasa y biovolumen total	34
Tabla 10. Matriz de actividades para establecer un protocolo para el monitoreo de Yahuarcocha.....	38
Tabla 11. Matriz de actividades estrategia para establecer un programa de educación ambiental en Yahuarcocha	45

RESUMEN

El lago Yahuarcocha es una fuente de aprovechamiento para las comunidades aledañas, por lo que se encuentra bajo una presión antrópica causadas por diferentes actividades, como turismo, comercio, agricultura y ganadería. Debido a esto el lago se ha incrementado los niveles de nutrientes como son nitrógeno y fósforo, lo que ha provocado una eutrofización acelerada. El objetivo de esta investigación es evaluar la diversidad de cianobacterias por medio de métodos de biología molecular como es el estudio de secuencias de ADN. Se utilizaron métodos de muestreo en lagos altoandinos, identificando los puntos de muestreo en las floraciones de cianobacterias y la columna de agua. Identificando 3 cepas de cianobacterias mediante microscopia, posteriormente se cultivó las cepas en un medio selectivo BG11 para su posterior extracción de ADN. En la PCR se tomó en cuenta un cebador molecular general para cianobacterias, dando como resultado al momento de la secuenciación el primer registro de *Planktothrix* sp, y de las dos especies *Cryptochroococcus tibeticus* y *Arthronema gyaxiana*. En el biovolumen se obtuvo que la biomasa que ocupan las cianobacterias en Yahuarcocha es del 97.9%, con las posibles cianotoxinas tales como anatoxinas, saxitoxinas que son las causantes de enfermedades hepáticas, nerviosas y dermatológicas. Se estableció una estrategia de control de cianobacterias enfocadas en dos proyectos de monitoreo del lago y educación ambiental, que servirán para ayudar a controlar posibles riesgos causados por las cianobacterias. Por lo que se concluye que la especie *Planktothrix* sp es la más dominante del ecosistema y la que se debe tener en cuenta para el control.

Palabras clave: Cianobacterias, toxinas, secuencias de ADN, biovolumen, eutrofización.

ABSTRACT

Lake Yahuarcocha is a source of income for the surrounding communities, so it is under anthropogenic pressure caused by different activities, such as tourism, commerce, agriculture, and cattle ranching. As a result, the lake has increased the levels of nutrients such as nitrogen and phosphorus, which has caused an accelerated eutrophication. The objective of this research is to evaluate the diversity of cyanobacteria by means of molecular biology methods such as the study of DNA sequences. Sampling methods were used in high Andean lakes, identifying sampling points in the cyanobacterial blooms and the water column. Three strains of cyanobacteria were identified by microscopy, then the strains were cultured in a selective BG11 medium for subsequent DNA extraction. The PCR considered a general molecular primer for cyanobacteria, resulting in the first record of *Planktothrix sp*, and the two species *Cryptochroococcus tibeticus* and *Arthronema gygaxiana* at the time of sequencing. The biovolume showed that the biomass occupied by cyanobacteria in Yahuarcocha is 97.9%, with possible cyanotoxins such as anatoxins and saxitoxins that cause liver, nervous and dermatological diseases. A cyanobacteria control strategy was established focused on two lake monitoring and environmental education projects, which will help control possible risks caused by cyanobacteria. Therefore, it is concluded that *Planktothrix sp* is the most dominant species in the ecosystem and the one that should be considered for control.

Keywords: Cyanobacteria, toxins, DNA sequences, biovolume, eutrophication.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Revisión de Antecedentes

Uno de los principales recursos en el planeta es el agua, ya que permite el desarrollo de la vida de varias especies y ecosistemas. La alta cantidad de nutrientes y floraciones de cianobacterias de agua dulce se están convirtiendo en un problema global que afecta este recurso, ya que son contaminantes microbiológicos cada vez más difíciles de controlar, especialmente para los recursos hídricos y los lagos naturales (Saelens, 2015a).

En los cuerpos de agua lénticos se producen diversas interacciones y procesos físicos, químicos y biológicos. En este tipo de ecosistemas se desarrollan varias especies que, al estar en contacto con varios contaminantes ligado a las presiones antrópicas, dificultando la capacidad de regeneración de los sistemas acuáticos, alterando las funciones de los demás organismos (Salomón et al., 2020).

Los ecosistemas acuáticos (lagos y lagunas) actualmente se encuentran vulnerados por la agricultura y las descargas de aguas residuales de los asentamientos urbanos. Los cuales provocan contaminación principalmente de metales pesados, sedimentos y exceso de nutrientes (Nitrógeno y Fósforo). Con el tiempo, esta situación afecta la cadena trófica y los ciclos fisicoquímicos, por lo que el lago es más vulnerable a la eutrofización. (Sharip et al., 2019).

La contaminación de los lagos ha sido una creciente problemática mundial, debido al incorrecto manejo del recurso y cuidado de los ecosistemas, también de la escasa gestión ambiental por parte de la comunidad que ha comprometido la salud del medio ambiente, causando varios riesgos ecológicos y el desarrollo de organismos perjudiciales para el ecosistema (Alcántara et al., 2020; Kurtz et al., 2021).

En los cuerpos de agua lénticos se producen diversas interacciones y procesos físicos, químicos y biológicos. En este tipo de ecosistemas se desarrollan especies que, al estar en contacto con varios contaminantes, dificultan la capacidad de regeneración de estos sistemas acuáticos. Las cianobacterias, cuando el ecosistema es alterado por la presión antrópica, se desarrollan convirtiéndose en un problema de riesgo biológico (Salomón et al., 2020).

Las cianobacterias son organismos que pueden ser perjudiciales cuando en los ecosistemas acuáticos se desarrollan de manera descontrolada. Estos pueden desarrollarse en diferentes condiciones ambientales, aumentando su biomasa en valores significativos, y, dependiendo de las variables fisicoquímicas, estos pueden desencadenar un desarrollo de floraciones nocivas para el ecosistema en el que estén. Las floraciones de cianobacterias, que producen toxinas, afectan negativamente la calidad del agua, y se convierten en un impacto negativo en las actividades recreativas (Mališová et al., 2021; Mosquera et al., 2017).

El lago Yahuarcocha es considerado como eutrófico, porque existe la sobreproducción primaria de la población de cianobacterias. Dado que representan un grupo de formación de floraciones nocivas en sistemas lacustres, encontrándose estrechamente relacionado con la eutrofización y alteraciones hidrológicas en los ecosistemas. Porque estos organismos fitoplanctónicos son capaces de crecer bruscamente bajo determinadas condiciones ambientales, acumulando gran cantidad de biomasa que, a su vez, contienen cianotoxinas que provocan la destrucción del medio ambiente (Portilla, 2015; Caicedo, 2016; Ochoa, 2017).

En la actualidad, para una investigación eficiente de ecosistemas lacustres, es necesario el estudio de secuencias de ADN. Esto permite la determinación de las especies de cianobacterias presentes, obteniendo una mejor perspectiva de la composición microbiana. Es una técnica muy eficaz y rápida al momento de identificar y evaluar el estado de los ecosistemas, y así determinar las acciones sobre la especie estudiada (Valenzuela et al., 2015).

El estudio de secuencias de ADN es uno de los métodos más importantes en la determinación de especies, debido a la mayor probabilidad de detección de las

mismas, particularmente para aquellas que se encuentran en bajas densidades poblacionales. Esta herramienta aporta una respuesta rápida para mitigar los impactos negativos de las proliferaciones de este tipo de organismos, como las poblaciones de cianobacterias (Riascos et al., 2018).

La importancia de esta investigación se enfoca a los cambios visuales evidenciados como el color, olor y el aumento de las floraciones de cianobacterias. Este tipo de microorganismos han modificado la dinámica de la cadena trófica del lago, además de ser la causa de reducir las poblaciones de especies benéficas y nativas de Yahuarcocha (Van Colen et al., 2017).

Estudiar los ecosistemas acuáticos y la relación de las cianobacterias permite conocer como avanza el deterioro de los lagos, ayuda a tomar medidas de mitigación y evitar los desastres provocados por contaminaciones biológicas, que producen las cianobacterias. Además, de evitar los riesgos de pérdida de lagos y causante de enfermedades por las sustancias químicas que producen las mismas (Yao et al., 2019).

1.2. Problema de Investigación y Justificación

Las fuentes de agua dulce, como los sistemas de agua lóticos y lénticos, han sido una fuente de aprovechamiento para el desarrollo de las personas por su alto valor ecosistémico. Entre estos sistemas, están los lacustres, los ríos, las aguas subterráneas, lagos y lagunas, todos estos presentan importancia para la ecología y en muchos casos para la economía y bienestar de una sociedad. Empieza una interacción de factores antrópicos en el ecosistema lacustre, los cuales pueden alterarse con facilidad, y se observa reflejando en un desequilibrio del ecosistema, pérdida de especies tanto de flora como de fauna, entre otros (Rao et al., 2021).

Dichas interacciones no son la excepción en Yahuarcocha. Este sistema dulceacuícola ha sido un punto de interés cultural, comercial y turístico para el cantón de Ibarra (Saelens, 2015). El lago, al ser un atractivo turístico, se ha visto envuelto bajo una presión antrópica tanto en sus orillas como dentro del mismo cuerpo de agua, ya que existen negocios comerciales aledaños, así como zonas

agrícolas, urbanas e infraestructura en sus alrededores. Por lo que ha desencadenado un deterioro progresivo y acelerado tanto en aspectos físicos y químicos, así como biológicos, en el lago (Jácome et al., 2018).

Según Ochoa (2017) estas circunstancias de igual manera afectan a la producción de organismos bióticos en el ecosistema, las macrófitas y cianobacterias son unos de los tantos organismos que los habitan. Específicamente, se mencionan a las cianobacterias las cuales son un grupo desarrollado que ha logrado subsistir en un amplio espectro de ambientes.

Siendo los primeros especímenes en habitar el planeta y los principales organismos responsables de la producción de oxígeno en la atmósfera desde hace millones de años. Las cianobacterias conservan una gran capacidad de adaptación en todo tipo de ecosistemas como calor, frío, salinidad e incluso con deficiencia de nitrógeno, porque las cianobacterias son las únicas en colonizar desde las regiones árticas hasta los pozos térmicos (Rao et al., 2021).

El lago Yahuarcocha representa una fuente importante para el turismo y economía de la ciudad de Ibarra y comunidades aledañas, es así como podemos mencionar la importancia de su conservación (Galarza y Pérez, 2019). A lo largo de los últimos años, e incluso décadas, actividades antrópicas desmedidas, como descargas de efluentes, aguas residuales, pesca y transporte en el lago (barcas), actividad turística como restaurantes, y el autódromo, han pasado a primer plano dejando de lado la calidad del ecosistema del lago, del mismo modo se ha perdido la gestión ambiental en la zona (Salcedo, 2019).

De esta forma, el escaso control de actividades, han perjudicado al lago hasta el punto actual, lo cual resulta en un proceso de deterioro que está reflejado por muchos factores negativos. Igualmente, estas dificultades se han evidenciado en los últimos años como son: por la falta de organismos bióticos en el medio, como peces, macrófitas y otros organismos que existían en abundancia y han disminuido en los últimos años (Caicedo, 2016).

Así mismo, existen alteraciones en el color o matiz del lago, ocasionado por su alto nivel de nutrientes y cianobacterias que generan una coloración verde en el cuerpo de agua, dificultando el paso de luz e incrementando del consumo de oxígeno, lo que desemboca en una disbiosis (Ochoa, 2017).

Analizando el objetivo general de la investigación y como este ecosistema ha sido mermado de una gestión ambiental, cabe mencionar que los ecosistemas se ven amparados por El Plan de Creación de Oportunidades (2021-2025). En donde, el objetivo tercero de dicho plan reconoce a la naturaleza como objeto de derecho, que ha sido omitido por los asentamientos aledaños y por actividades antrópicas que se realizan en Yahuarcocha. El asumir la reparación integral de esta zona mediante un manejo sostenible del patrimonio es obligación de tanto personas naturales como jurídicas (Plan-de-Creación-de-Oportunidades-2021-2025, 2021).

1.3. Preguntas Directriz de la Investigación

- ¿Existe una alta diversidad de cianobacterias en el lago eutrófico Yahuarcocha evaluadas por secuencias de ADN?
- ¿El estudio de secuencias de ADN presenta una alta eficiencia para determinar cianobacterias en el lago eutrófico de Yahuarcocha?
- ¿Las estrategias propuestas en esta investigación podrían ayudar a controlar las cianobacterias presentes en Yahuarcocha?
- 1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar la diversidad de cianobacterias en el lago eutrófico Yahuarcocha por medio del estudio de secuencias de ADN

1.4.2. Objetivos Específicos

- Identificar la riqueza de especies de Cianobacterias existente en el lago Yahuarcocha.

- Evaluar la relación entre la calidad de agua y las especies de cianobacterias identificadas a través del estudio de secuencias de ADN.
- Proponer estrategias de control del recurso agua en el lago Yahuarcocha, como medida de mitigación de impactos causados por las cianobacterias.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Dinámica de los Lagos de Alta Montaña de Ecuador

Los lagos de alta montaña se sitúan entre los 2000 a 3000 m.s.n.m. Generalmente, se encuentran cerca de las cadenas montañosas, y se consideran uno de los componentes más valiosos para la vida por sus servicios ecosistémicos, el desarrollo y el equilibrio (Mosquera et al., 2017). La alteración de estas fuentes de agua representa un daño crítico para el ambiente y también para los organismos que se desarrollan. A su vez, están influenciadas por los asentamientos urbanos que crecen cada constantemente, y se genera una presión antrópica, es decir, que las actividades humanas degradan estos ecosistemas (Steinitz et al., 2020)

Todo organismo biótico y variables abióticas nutren el equilibrio del ecosistema, en especial los organismos vivos que subsisten del recurso agua. Las funciones y servicios ecosistémicos que ofrecen los lagos también representan un eje para el desarrollo de las comunidades aledañas. Igualmente, ayudan a un sin número de factores como es la regulación de flujos hidrológico, reducción de la erosión y sedimentación en el suelo, mantenimiento o mejoramiento de la calidad de agua, recarga de los acuíferos y como hábitat acuático (Mosquera et al., 2022).

Los factores ambientales que influyen en la estabilidad y productividad de los ecosistemas acuáticos están relacionados con el desarrollo de los lagos. Todo ecosistema acuático está conformado tanto por factores bióticos como abióticos. Los factores abióticos se encuentran formados por elementos no vivos o inertes, los cuales están implícitos en el medio y forman parte vital en su desarrollo (Steinitz et al., 2020). Entre los aspectos más importantes para el desarrollo de las cianobacterias cabe destacar la luz solar, el agua, el oxígeno y la materia inorgánica como sales y minerales, que condicionan las variables fisicoquímicas para un mejor desarrollo y subsistencia del ecosistema (Sharip et al., 2019).

Entre todos estos componentes, la biota de los lagos está conformada por todos los organismos que se desarrollan en el ecosistema. Desde los unicelulares

como bacterias o más desarrollados como fitoplancton y zooplancton, que forman parte de la cadena alimenticia para que se desarrollen animales y plantas (Rao et al., 2021).

De la misma manera, en Yahuarcocha se ha desarrollado un ecosistema diverso, pero se ha visto afectada directa o indirectamente por las actividades antrópicas. Este lago presenta un estado actual bastante crítico con un porcentaje alto de nutrientes, que es visible por su excesivo color verdoso en sus aguas y otros contaminantes (Galarza y Pérez, 2019; Ochoa, 2017).

2.2. Biovolumen Fitoplanctónico

Es conocido como uno de los parámetros más útiles al momento de determinar la biomasa de cianobacterias. En este caso en el grupo de cianobacterias, ayuda a determinar la biomasa que ocupan estos microorganismos en ecosistemas acuáticos. Además, integran algunos parámetros que determinan el estado de alerta de los cuerpos de agua, debido a la presencia de especies potencialmente tóxicas y dominantes sobre organismos que ayudan a controlar la eutrofización de estos ecosistemas. Es importante conocer el volumen total que ocupan las comunidades fitoplanctónicas que ayuden a controlar la proliferación de las colonias cianobacteriales (Chin et al., 2022).

La biomasa fitoplanctónica es uno de los parámetros más eficaces cuando se estudia los ecosistemas acuáticos con niveles altos de eutrofización. Porque constituyen un análisis con las variables necesarias para estudiar las redes tróficas, y conocer como los organismos transforman el carbono en fuentes de carbono orgánico (Rolim et al., 2020).

Es por ello por lo que se analiza las estimaciones de biovolumen con varios indicadores y metodologías, cada uno con diferentes niveles de precisión y diferentes cargas de trabajo. En esta investigación se usó la metodología mediante microscopia, la principal intención es calcular un valor de biomasa cianobacterial en un ecosistema y determinar los niveles de riesgo tanto para el medio ambiente como para la salud humana (Haakonsson et al., 2020).

2.3. Cianobacterias de lagos andinos

Las cianobacterias representan el grupo más amplio y grande de procariotas, son organismos fitoplanctónicos y, se caracterizan por desarrollarse y colonizar en ambientes con variables diferentes, estos ambientes pueden extenderse desde océanos, ríos, suelos hasta pozos termales (Salomón et al., 2020).

La ecología de las cianobacterias ha tomado gran importancia desde el campo productivo y biogeoquímico, ya que estas especies tienen capacidades importantes como la de fijación de nitrógeno atmosférico al ser un componente importante de poblaciones microbianas del suelo. Cuando estas se desarrollan en un lago en condiciones de eutrofización generan grandes problemas medioambientales debido a que producen sustancias químicas y toxinas en cantidades que no se pueden controlar (Mališová et al., 2021).

Las cianobacterias son organismos que pueden crecer en un entorno con condiciones no óptimas para el fitoplancton en general, esto se debe a su adaptabilidad a diversas condiciones como las intensidades de luz baja, pH alto, temperaturas altas o bajas. La formación de floraciones, generalmente tóxicas, condicionan al medio en el que se desarrollan, aumentando la turbidez del entorno y produciendo mal olor ((Palacio et al., 2019).

En algunos casos estas pueden entrar en contacto con condiciones favorables, es decir con el exceso de nutrientes que aumentaría el tamaño de sus poblaciones. De igual forma, en algunos casos son nocivos para la columna de agua debido a que muchas de las especies que presentan dominancia sobre otras se caracterizan por producir cianotoxinas lo cual desplaza otros organismos presentes (González et al., 2019).

La mayoría se caracterizan por su típico color verde y azul, esto se debe a la presencia de pigmentos que cambian su coloración, como las ficobilinas, el cual es un pigmento proteico que se caracteriza por ser soluble en agua y ayuda a la fotosíntesis en cianobacterias (Alcántara et al., 2020).

2.4. Cianotoxinas en cianobacterias

Actualmente existen varias especies de cianobacterias que producen las denominadas cianotoxinas, y la producción de estas varía dependiendo de cada especie. Existen, cianotoxinas más dañinas que otras para el medio en el cual se desarrollan, tales como son las hepatotóxicas, citotoxinas y neurotoxinas. Cabe mencionar que en muchos casos las toxinas producidas por cianobacterias son metabolitos secundarios ya que, estos se relacionan con la formación de foto pigmentos, el crecimiento, la reproducción o el metabolismo de los individuos (Oehrle et al., 2017).

Estos se van acumulando en el citoplasma, lo cual hace referencia a que la cantidad de toxinas es directamente proporcional a la biomasa. Al momento en que el medio no es apto para las cianobacterias estas mueren produciéndose la lisis celular, esto provoca que todas las toxinas acumuladas se liberen al ambiente de manera que el peligro latente de intoxicación se prolonga más tiempo del que dura la floración (Chin et al., 2022).

Las cianotoxinas pueden tener un efecto casi inmediato en muchos organismos a los que estén expuestos, esto puede ir desde algo tan simple como irritación en la piel, e ir escalando hasta generar problemas más complejos como alteraciones a nivel neuromuscular, bloqueo de canales de sodio e inhibición enzimática y proteica, lo cual causa anomalías por la exposición crónica a nivel gastrointestinal, inmunosupresión y la promoción de tumores (Sant'Anna et al., 2008).

2.5. Secuencias de ADN para cianobacterias

La molécula de ADN tiene forma de doble hélice y está compuesta de cuatro componentes principales, estos se los denomina bases: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). Este método molecular ayuda a determinar la información genética que está codificada en un gen, y permite la descripción de variaciones y características de organismos (H. Li et al., 2019). La secuenciación es un método molecular que permite el estudio de varios organismos, este proceso

ayuda analizar los nucleótidos (A, G, C y T). En la ruptura del ADN se producen varios fragmentos pequeños que son utilizados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en conjunto con cebadores, para la creación de miles de copias de fragmentos específicos. Los genes detectados son los fragmentos que se utilizan para la identificación molecular de las especies que se encuentran en estudio (Casamatta et al., 2020).

2.6. Caracterización molecular de cianobacterias

Las técnicas moleculares son de gran importancia en el estudio de organismos vivos, porque permiten la obtención de información necesaria para la identificación de especies. En el caso de las cianobacterias los estudios sobre diversidad genética y taxonomía molecular ha tomado relevancia, porque permiten la caracterización de todo tipo de cianobacterias como son las de origen nocivo, que forman blooms o florecimientos (Nübel et al., 1997; Handsley et al., 2021). Las técnicas de nueva generación permiten la obtención de una mayor cantidad de información y velocidad en el análisis de datos. Las técnicas moleculares se utilizan con mayor frecuencia para la complementación de información taxonómica de un grupo de organismos. En el caso de cianobacterias estas pueden clasificarse basadas en la información de reconstrucción filogenética para un gen conocido como ARNr 16S, que detalla las funciones estructurales y la composición (Zhang et al., 2021).

2.7. Marco Legal

En el trabajo presentado a continuación se lo defenderá por medio de normativas legales que rigen el Ecuador, toda normativa está vigente hasta la actualidad así mencionando la Constitución de la República la cual se encuentra en vigencia desde el 2008, la cual concede derechos a la naturaleza y la promueven desde un enfoque sustentable y sostenible, ya que se mencionan los “Derechos del buen vivir” en los cuales la Sección primera sobre el agua y la alimentación nos mencionan el Art 12 el derecho que poseen los humanos al recurso agua y la importancia del mismo por ser patrimonio estratégico e inalienable además de esencial para la vida; a la par de reconocer el derecho de las personas de vivir en un

ambiente sano y equilibrado ecológicamente hablando (Asamblea Nacional Constituyente de Ecuador de 2007-2008, 2008).

En el capítulo séptimo de la constitución sobre los Derechos de la naturaleza el Art 71 y Art 72 se establece la responsabilidad de personas naturales o jurídicas a la protección de la naturaleza además de tener derecho a una restauración, en caso de impactos ambientales graves o permanentes y será el estado quien establecerá medidas eficaces para alcanzar la restauración (Asamblea Nacional Constituyente de Ecuador de 2007-2008, 2008).

En el Convenio sobre la Diversidad Biológica la conservación de la diversidad biológica es interés común de toda la humanidad. cubre la diversidad biológica a todos los niveles: ecosistemas, especies y recursos genéticos las metas del objetivo estratégico D establecen el uso sostenible de los componentes de diversidad biológica y la investigación de ecosistemas con la finalidad de promover y contribuir a la conservación y uso de los recursos además de la concienciación de la comunidad, también los servicios relacionados con el agua (Convenio sobre Diversidad Biológica, 1992).

Por su parte el convenio Ramsar el cual nos menciona la importancia de la conservación de los humedales nos indica que estos deben usarse de forma racional, de tal forma que se aprovechen sus recursos ecosistémicos sin alterar ni mermar el ecosistema como es el caso de los lagos, debido a que estos nos proporcionan el recurso dulceacuícola, a la vez también son hábitat de muchos organismos y microorganismos por lo que son de vital importancia en la conservación de la biodiversidad y sirven como amortiguadores de la naturaleza lo cual ayuda a mantener el equilibrio ecosistémico.

En las leyes orgánicas dentro del Código Orgánico de Organización Territorial (COOTAD) del Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal se menciona en el capítulo II sección primera Art 54 es función del gobierno autónomo descentralizado regular, prevenir y controlar la contaminación en territorio cantonal, también se puede mencionar el Art 65 sobre el incentivar el desarrollo de actividades comunitarias con el fin de preservar y proteger al ambiente, en el Título

V del acuerdo ministerial 061 sobre la calidad de los componentes bióticos y abióticos en el Art 196 sobre que garantiza el no autorizar las descargas de aguas servidas o industriales a cuerpos que el caudal no pueda soportar la descarga, la capacidad de descarga a un cuerpo hídrico será determinada por la autoridad única del agua (Código Orgánico del Ambiente, 2017).

En el Código Orgánico Ambiental menciona en el Capítulo IV sobre la importancia de la conservación de ambiente naturales vegetales estos incluyen humedales como manglares, moretales y paramos, en los cuales se da a conocer la prohibición de la alteración de dichos ecosistemas. Además, el Código Orgánico Ambiental garantiza y considera de gran (Escalera et al., 2019) importancia la conservación y el control para la contaminación con el fin de proteger este recurso y sea aceptable, asequible para uso recreacional y doméstico, en donde el estado garantizara la conservación, recuperación y manejo integral del recurso hídrico en todas sus formas, además se regulará toda actividad que pueda afectar la calidad y cantidad de agua (Código Orgánico Del Ambiente, 2017).

En la Ley Orgánica de Recursos Hídricos Usos y Aprovechamiento del Agua en el título I capítulo I en los Art 1 y Art 3 se establecen que los recursos hídricos son de vital importancia para la supervivencia de los seres vivos en el planeta tierra por esta razón establecen que el agua es un recurso del patrimonio nacional y normaliza la conservación y preservación de las fuentes de recursos hídricos (Asamblea Nacional del Ecuador, 2014).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Descripción del Área de Estudio

El lago de Yahuarcocha se encuentra en la parte norte de los Andes de Ecuador, es un lago alto andino de la provincia de Imbabura en el cantón de Ibarra (Figura 1). Está ubicada a 2 190 m.s.n.m en la zona del callejón interandino. La temperatura oscila desde los 5°C a 25°C, y en la parte baja es donde está ubicado el cuerpo de agua, que cuenta con un área de 2.61 km² (Riascos et al., 2018). El sistema lacustre está ubicado en una depresión volcánica rodeada por zonas agrícolas, urbanas y obras de infraestructura. La presión antrópica de las actividades que se realizan a las orillas de la microcuenca son características que resaltan en el lago de Yahuarcocha. De igual forma, elevan los niveles de eutrofización representando el aumento de productividad primaria por la carga de nutrientes y sedimentos de la microcuenca (Terneus, 2017).

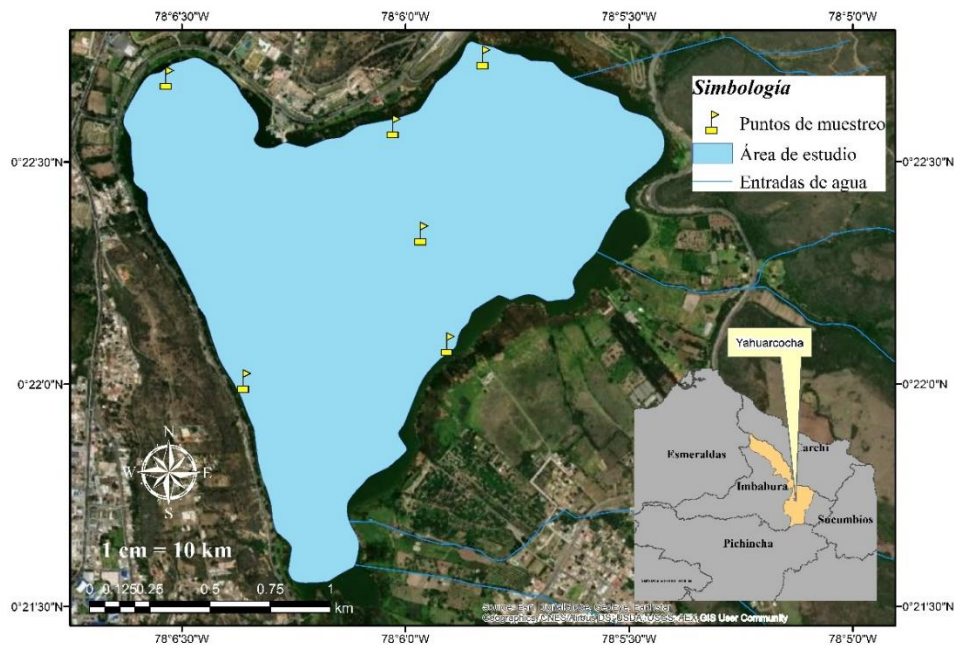


Figura 1. Ubicación geográfica del área del lago Yahuarcocha

- **Clima**

El lago de Yahuarcocha posee un clima generalmente cálido y templado, la precipitación es significativa, con precipitaciones incluso durante el mes más seco. De acuerdo con la clasificación de Köppen se clasifica como clima ecuatorial (af), la temperatura media anual es de 16.0 °C y la precipitación aproximada es de 1784 mm anuales.

- **Ecosistema**

Es ecosistema lacustre, posee una variedad de especies de flora y fauna, es uno de los acuíferos de importancia ecológica en Imbabura. Está conformado por una diversidad de especies como plantas acuáticas y animales que habitan el lugar. Existen especies de peces en el sistema, aunque también se ve afectado por la introducción de especies exóticas que alteran el ecosistema (Portilla, 2015).

- **Condiciones fisicoquímicas del Lago**

Sus condiciones fisicoquímicas son que posee una temperatura de la columna de agua de 21.4°C. Además, posee un pH: 8.9, la cantidad de oxígeno disuelto con 76.2% y el punto de mayor profundidad de 6.9 metros (Van Colen et al., 2017a).

3.2. Métodos

3.2.1. Identificación de la riqueza de especies de Cianobacterias existente en el lago Yahuarcocha.

Para la identificación de especies de cianobacterias se realizó un proceso de muestreo para una previa identificación de especies. Los análisis fueron realizados utilizando técnicas moleculares que permitieron un estudio más detallado de las especies presentes en el área de estudio. De igual manera, se detallaron los métodos que se usaron para la identificación de cianobacterias en un lago eutrófico.

3.2.1.1. Protocolo de toma de muestras

El muestreo realizado para el análisis en el laboratorio se realizó mediante los scums o acumulaciones en el espejo de agua de las floraciones de cianobacterias. Se requirió recolectar muestras que sean representativas según las características del lago como fue a diferentes profundidades, debido a que el lago presenta un máximo de 6m. Así mismo, en diferentes puntos para que sean representativas, aunque cabe recalcar que el cuerpo de agua presentaba una composición homogénea (figura 2) y analizando el área de estudio se trabajó en 6 puntos de muestreo (Tabla 1).

Tabla 1. Puntos de muestreo del lago Yahuarcocha

Punto de muestreo	Referencia	Coordenadas UTM
YH1	Entrada a Yahuarcocha	0.377414, -78.11020
YH2	Muelle de botes	0.378657, -78.10853
YH3	Juegos infantiles	0.375596, -78.10444
YH4	Vuelta de la paloma	0.377605, -78.09205
YH5	Salida del pueblo	0.367153, -78.09939
YH6	Columna de agua	0.372965, -78.10329

Los puntos de muestreo fueron seleccionados por criterio visual, considerando principalmente los sitios que contenían mayor acumulación de floraciones (Figura 2B). Posteriormente, las muestras líquidas recolectadas fueron almacenadas en frascos oscuros y en cadena frío para evitar que exista alguna alteración en las muestras. Posteriormente, todos los frascos fueron rotulados y transportados al laboratorio. En el sexto punto se realizó un muestreo en la columna de agua a una profundidad de 6m (6-5-4-2-0.5 m) y se utilizó un disco secchi para ver la turbidez del lago. Se utilizó una botella vertical de tipo Van Dorn (Figura 2A), para coleccionar las muestras líquidas en la mayor parte de columna de agua y obtener un análisis más preciso de la diversidad de cianobacterias (Almanza, et al., 2016).



Figura 2. Muestreo del lago Yahuarcocha (A) Botella de Van-Dorn (B) toma de muestras

La identificación taxonómica se realizó en un microscopio invertido Leica, también se utilizó libros y bibliografía actualizada de las claves taxonómicas sobre fitoplancton. Se utilizó una muestra fresca, sin rastro de degradación la cual permitiera la descripción de las estructuras características de las cianobacterias y describir el género al que podrían pertenecer. Se registraron las características de coloración, tamaño y la estructura de las especies. Se aplicó una tinción con tinta china para la identificación de las vainas mucilaginosas y algunas estructuras para la identificación de las vainas mucilaginosa y aerotopos (Carvalho et al., 2022). La bibliografía taxonómica facilitó relacionar la morfología de las cianobacterias y tener una línea base de los géneros presentes, como se evidencia en la Figura 3 (Saelens, 2015).

Se realizó la identificación de especies de muestras conservadas en formol, desde el año 2015 al 2020, para el análisis multitemporal de las especies presentes en Yahuarcocha y los cambios que ha sufrido en ese lapso.

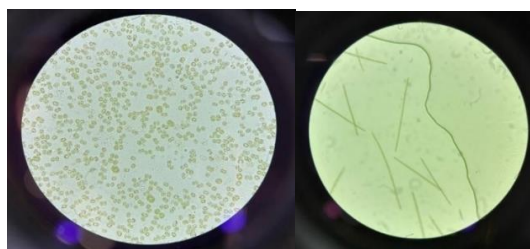


Figura 3. Proceso de identificación de las especies presentes en microscopia lente 40x

3.2.1.2. Cultivo de cianobacteria en medio selectivo BG11

Según Morales et al. (2017) estableció un medio selectivo para cultivar las especies de cianobacterias denominado BG11, en donde se deben preparar 4 stocks (Anexo 1): stock1: EDTA (tritríplex) di sódico 0.1 g/l; citrato férrico de amonio 0.6 g/l; Ácido cítrico 0.6g/l; cloruro de calcio 3.6g/l ; stock 2: sulfato de magnesio heptahidratado 7.5g/l; Stock 3: fosfato monohidrógeno di potásico 3.05g/l; stock 4: ácido bórico 2.86g/l; cloruro de manganeso tetrahidratado 1.82 g/l; sulfato de zinc heptahidratado 0.222 g/l; sulfato de cobre pentahidratado 0.079 g/l; cloruro de cobalto hexahidratado 0.05 g/l; molibdeno de sodio dihidratado 0.391 g/l, ajustando a un pH: 8. Además, en el medio de cultivo se añadieron los antibióticos cicloheximida y cloranfenicol en las cantidades de 1.5 ml y 6 ml, respectivamente por cada litro de medio. La finalidad de los antibióticos fue la inhibición del crecimiento de bacterias ajenas al medio y promover el crecimiento de los organismos deseados como son las cianobacterias (Escalera et al., 2019).

Inicialmente, el medio BG11 fue preparado en estado líquido y agregado en tubos de ensayo en una cantidad de 15 ml. Se agregó 20 ml de muestras líquidas de Yahuarcocha con la intención de cultivar fitoplancton incluido en este grupo las cianobacterias, e incubadas en una cámara con un fotoperiodo 18:6 a temperatura ambiente y agitación por 4 días. Por otro lado, el medio de cultivo líquido fue modificado agregándole agar (24 g/L) para realizar siembras en medio sólido y diferenciar las colonias de cianobacterias. Para la esterilización del medio de cultivo se lo realizó en una autoclave a 103 kPa, 120°C por 45 min (Grossmann et al., 2020).

Para realizar la siembra de las cianobacterias en medio de cultivo sólido, se utilizaron aquellas que crecieron en el medio líquido. Para esto se utilizó un hisopo estéril y placas de medio BG11 sólido, en donde se realizaron estrías y fueron almacenados en una incubadora a 21°C (Chen et al., 2021). El fotoperiodo fue de 16 horas de luz y 8 de obscuridad (Tokodi et al., 2018)

3.2.1.3. Extracción, PCR y Electroforesis

En la extracción de ADN se tomó en cuenta la cepa de cianobacterias más puras cultivadas en el medio BG11 determinadas por tinción en lugol. Luego se procedió a aplicar el protocolo de extracción de ADN de Riascos et al. (2018) detallado en Anexo 2. La concentración de ADN fue determinada mediante el fluorómetro Qubit 4.0 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la PCR se tomó en cuenta los cebadores moleculares de la Tabla 2 localizados en la región ARNr 16S, en donde se realizó una mezcla equimolar entre los dos cebadores reverse para obtener una mayor efectividad. La composición equimolar consistía en la mezcla de los cebadores reverse: 781a y 781b, en las proporciones de 50 μ l de cada cebador (Nübel et al., 1997). Además, cada uno los cebadores reversen tenían que encontrarse previamente diluidos en concentraciones de 10 μ M. Para la preparación de la mezcla maestra de PCR se utilizó: 12.5 μ l de Go Taq® Green Máster Mix (2X Buffer de reacción Green Go Taq® pH 8.5, 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP y 3 mM MgCl₂), 0.4 μ M de cada cebador, 9.25 μ l de agua estéril ultrapura y 1.25 μ l de ADN. El programa usado en el termociclador (Eppendorf®) para la PCR, comenzó con una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, la temperatura de fusión de los cebadores a 52°C para M1YH CYA Y M2YH CYA y 60° para M3YHCYA durante 8 s, seguido de 62°C por 1 min, y la elongación a 72°C por 1 min. Para finalizar se realizó una elongación final a 72°C por 10 min.

Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 1%, teñido con el colorante SYBR® Safe y con un peso molecular de 1 Kb. El gel de electroforesis fue corrido durante 40 minutos a 100V, para después ser revelado en un transiluminador (Invitrogen) (Casamatta et al., 2020).

Tabla 2. Cebadores moleculares para cianobacterias

Marca de Primer	Secuencia
CYA106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA
CYA781Ra	GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT
CYA781Rb	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT

Fuente: (Nübel et al., 1997)

3.2.1.4. Purificación de productos PCR y secuenciación

Se purificó un producto PCR de 25 ul utilizando el kit de purificación Qiagen QIAquick PCR Purification, siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación fue realizada por Macrogen, Korea. Las secuencias obtenidas fueron curadas con el software Geneious versión 2.1. Posteriormente, fueron comparadas mediante un BLAST con la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se diseñó un árbol filogenético con el software MEGA 11.

3.2.2. Evaluación de Calidad de Agua en Base a las Cianobacterias

3.2.2.1. Conteo de Número total de Células

Para el conteo del número total de cianobacterias presentes se utilizó las cámaras de sedimentación Sedgwick Rafter como se observa en la figura 6 (Rao et al., 2021). Se utilizaron muestras frescas y se procedió a colocarlas en una jeringa para poder romper las vesículas de gases que poseen y luego poner a sedimentar durante 15 minutos. Las cámaras tienen 50 mm por 20 mm de cada lado y una profundidad de 1mm, para los conteos se aplicó la cantidad de 1ml de muestra de agua de Yahuarcocha y se usó la relación de número total de células por 1ml. Para el recuento de especies se realizó un recorrido de la cámara analizando la densidad del fitoplancton y se obtuvo la frecuencia de individuos por especie (Almanza, et al., 2016).

3.2.2.2. Concentración de Clorofila a

Para la cuantificación de clorofila se utilizaron muestras frescas de Yahuarcocha, y se aplicaron 3 pasos para la obtención de datos: Filtración, extracción y lectura. En la filtración se tomaron las muestras de agua y se las paso por una red de zooplancton, luego se los filtro por una membrana de celulosa de 0.4um de espesor. Estos filtros fueron cortados en pedazos más pequeños y colocarlos en tubos de ensayo realizando 3 repeticiones.

Luego se agregó metanol 50 mL y fueron incubados a una temperatura de 9°C durante 24 horas. En el proceso de extracción se utilizaron microtubos eppendorf de 2ml para poder centrifugar las muestras de clorofila, se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm, y después se procedió a trasferir el sobrenadante a tubos nuevos. Este proceso se realizó en bajas temperaturas (4°C) y en condiciones de oscuridad para evitar la degradación de las muestras y reducir al mínimo la fotoxidación del pigmento. En el proceso de lectura de clorofila extraída se usó una cubeta plástica para la medición con en el Fluorómetro (Aquaflor) canal A (Ballejos et al., 2017; Bursztyn et al., 2022)

3.2.2.3. Biovolumen de las Cianobacterias Totales

Para calcular el biovolumen se aplicó la metodología descrita por Palacio et al., (2019) que es la metodología por microscopia y aplicación del software PHYTOBS usando el índice IPLAC (Performance of the Phytoplankton Index for Lakes), que es un índice multimétrico que tiene en cuenta la abundancia y la composición de las especies de las comunidades de cianobacterias. Se realizó una estimación de la biomasa que ocupan las especies de cianobacterias en el lago Yahuarcocha, se aplicó la fórmula del Biovolumen ($\mu\text{m}^3/\text{mL}$) = V (Volumen geométrico) * N (Conteo celular), debido a que las cianobacterias varían entre tamaño y forma, su estimación fue realizada por separado y se obtuvo el promedio.

Se utilizó la base de datos global MySQL para fitoplancton, donde están registrados las figuras geométricas de las especies de cianobacterias y los volúmenes necesarios para obtener el biovolumen específico cada muestra

analizada (Caracciolo et al., 2022; Lefebvre y Dezécache, 2020). Se identificó la densidad poblacional y la biomasa que ocupan en los ecosistemas, así como la cantidad de toxinas que producen por biovolumen para el cual se aplicó un índice IPLAC index establecido por el programa PHYTOBS (Almanza, et al., 2016). Evaluando la relación superficial, dimensión lineal del lago y columna de agua, además de la concentración de clorofila extraída, se pudo conocer el porcentaje de cianobacterias en el ecosistema expresado de la siguiente manera.

$$\%CIANO = \left(\frac{BVOL_{CIA} - [BVOL_{CHR} - (BVOL_{MIC} + BVOL_{WOR})]}{BVOL_{TOT}} \right) \times 100$$

Para observar la relación entre la calidad de Yahuarcocha y la presencia de cianobacterias se analizó (Biovolumen total y clorofila) y realizó un análisis de estadística descriptiva. Este análisis permitió la comprensión de la influencia de las especies de cianobacterias identificadas, además fue usado para conocer la fuerza y dirección de la asociación entre las variables mencionadas, ya que las muestras poblacionales fueron grandes, fue necesario saber con precisión si existe relación entre sí (Chaffin et al., 2018). Todo el análisis estadístico se realizó en el software Infostat con la finalidad de obtener el nivel de intervalos y saber cuál especie tienen mayor influencia en la calidad de agua, la relación lineal de las variables y la bivalente distribuida que ayudo a conocer cuál especie presenta mayor influencia (Haakonsson et al., 2020, Jacobo y Flores, 2021).

3.2.3. Estrategias de control, como medida de mitigación.

Para establecer estrategias de medida y control para el recurso agua con respecto a los florecimientos de cianobacterias se analizó el peligro ambiental, comparando los límites permisibles que establecen la ONU para la salud humana, y la UNESCO para servicios recreativos acuáticos, que representan en el ecosistema. Para lo que se elaboraron proyectos para controlar las floraciones de cianobacterias y algas nocivas en cuerpos de agua con énfasis en un protocolo para realizar monitoreos mensuales y fichas con la descripción de las especies enfocándose en la educación ambiental. Todo utilizando la información obtenida en los resultados de esta investigación.

Se aplicó la matriz de doble entrada, la cual permite identificar las causas-efectos, se utilizó para el reconocimiento de las afectaciones causadas por las cianobacterias contribuyendo a la identificación de los problemas más evidentes y de esta forma generar alternativas de control de las especies estudiadas. La calificación de los problemas dentro de la matriz dependerá única y exclusivamente del investigador (Ponce, 2006).

Se aplicó una matriz de seguimiento de actividades para identificar los elementos claves para el control de especies de cianobacterias que están afectando (limitando o favoreciendo) el desarrollo del ecosistema, con el propósito de definir y ejecutar acciones correctivas o impulsoras para la conducción de cada una de las actividades (Sánchez et al., 2018).

Tabla 3. Diseño de matriz de actividades

Título de proyecto						
Objetivo del proyecto						
Actividad	Recursos	Fecha de ejecución	Resultado	Responsables		
N1	Todos los recursos (Económicos y sociales)	Lapso del proyecto	Meta para alcanzar en ese tiempo	Los encargados de elaborar el proyecto		

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados corresponden al análisis realizado para los objetivos específicos planteados en esta investigación.

4.1. Identificación molecular de las Especies de Cianobacterias

Se analizaron las muestras de 6 puntos seleccionados y se determinaron las siguientes especies en el lago Yahuarcocha: *Planktothrix* sp con un % de similitud de 99.4% y con dos números de accesión correspondientes a las dos especies que tuvo mayor similitud, las cual esta detallada en el árbol filogenético del Anexo 3, *Cryptochroococcus tibeticus* con un % de similitud de 84.57% y *Arthronema gygaxiana* con un % de similitud de 98.53% (Tabla 3).

Tabla 44. Especies analizadas por secuencias

Código	Género/especie	% similitud	Gen	Calidad de secuencia (%)	N° accesión
M1YH CYA	<i>Planktothrix</i> sp.	99.4		87.4	NR 112126 NR 112124
M2YH CYA	<i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	84.57	ARNr 16S	94.9	NR 176545.1
M3YH CYA	<i>Arthronema gygaxiana</i>	98.53		95.2	NR 176478.1

Además, fueron determinadas las diferentes concentraciones de ADN de cada cianobacteria y se detallan en la tabla 3. Estas especies detectadas fueron analizadas y han sido encontradas desde años previos, en estudios donde existen reportes de crecimiento de las floraciones de cianobacterias (Ochoa, 2017). Actualmente, la especie de *Planktothrix* sp fue distribuyéndose en todo el ecosistema hasta convertirse en la especie más dominante. Esto ocurrió a causa de sus características de adaptación (Condiciones de temperatura, pH, turbidez, cantidad de nutrientes) por lo que se ha convertido en una especie de interés científico a nivel mundial.

Planktothrix sp ha representado ser una de las más tóxicas y peligrosas para los ecosistemas acuáticos y para la salud humana(Wejnerowski et al., 2020). La mayoría de las cianobacterias producen cianotoxinas y alrededor del 75% de estas producen toxinas potencialmente peligrosas. Sin embargo, la especie mencionada produce 9 tipos de toxinas y más de 90 variantes como menciona Albrecht et al. (2017).

Tabla 55. Concentración de ADN

Especie	Cuantificación ug/ul
<i>Planktothrix</i> sp.	3.34
<i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	0.732
<i>Arthronema gygaxiana</i>	0.656

A través del análisis por microscopía fueron observadas las características que diferencian a estas especies de otras (Figura 4):

Planktothrix sp. Es una especie que corresponde al orden Oscillatoriales, las cuales se caracterizan por ser células filamentosas con un promedio de 180 μ m de tamaño celular y no poseen heterocistos ni acinetos. Es una de las cianobacterias productoras de numerosas toxinas tales como: saxitoxinas, cylindrospermopsina y anatoxinas que afectan a los ecosistemas y los organismos que se desarrollan en el mismo (Derot et al., 2020).

Está ubicada en latitudes (2300-2800 m.s.n.m.), lagos poco profundos y turbios donde puede tolerar la mezcla continua de la columna de agua, lagos claros y profundos alpinos que están estratificados estacionalmente(Wejnerowski et al., 2020). Generalmente, se desarrollan en Europa, Asia y África, conteniendo una característica importante que es la capacidad de almacenar nitrógeno, mecanismo que les permite crear floraciones más espesas(Containing et al., 2021).

Cryptochroococcus tibeticus, esta especie corresponde al orden Chroococcales, esta caracterizado por ser células coloniales, unicelulares, forman floraciones, el tamaño celular es de 4 μ m y las colonias tienen 30 μ m, producen toxinas específicas que afectan al sistema hepático (Wang et al., 2021). Esta especie

presenta una tasa de crecimiento alta incluso entre otras especies, es decir, crece con mayor rapidez que otros géneros de cianobacterias, puede deberse a sus colonias que presentan agrupaciones regulares, alargadas o circulares, de igual manera esta especie se conoce que puede producir compuestos tóxicos denominados microcistinas el cual es un compuesto derivado de los polipéptidos los cuales pueden causar graves daños a la salud como daños renales (Mohsin Ibrahim & Abbas Buhlool, 2015).

Arthronema gygaxiana, esta especie corresponde al orden Nostocales, está caracterizada por ser células filamentosas y poseen heterocistos. Su tamaño celular es de un promedio de 30 μm , pueden ser rectos, curvados, enrollados regular o irregularmente, producen toxinas tales como: anatoxinas, cylindrospermopsina, microcistinas y saxitoxinas (Thu et al., 2020). Según Mehinto et al., (2021) mencionan que existen evidencias abundantes de efectos adversos potencialmente severos para la salud humana y de animales del ecosistema, asociados con la formación de floraciones superficiales de cianobacterias tóxicas, aunque existen pocos casos reportados por los centros de salud por la poca información para asociar enfermedades hepáticas, gastrointestinales, nerviosas o dermatológicas producidas por cianobacterias. En su estudio Geerling y Magee, (2017) mencionan que las toxinas más comunes en todas las cianobacterias son las saxitoxinas y las anatoxinas, pero dependiendo de la biomasa que tengan en el ecosistema pueden ser perjudiciales para la salud humana, no obstante, en el ecosistema generan un desequilibrio en la cadena trófica.

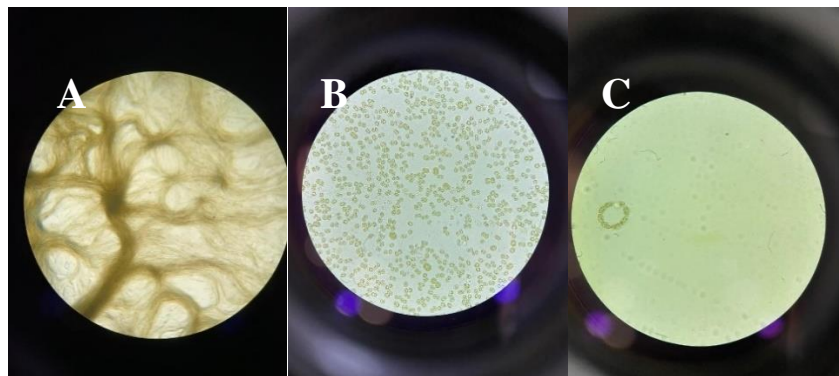


Figura 4. Especies de cianobacterias: (A) *Planktothrix* sp. (B) *Cryptochroococcus tibeticus* (C) *Arthronema gygaxiana*

4.1.1. Análisis multitemporal de especies de cianobacterias

En el análisis multitemporal se identificó que la especie con mayor densidad poblacional en anteriores estudios fue *Cylindrospermopsis raciborskii*, manteniéndose como la más dominante hasta inicios del año 2018 (Ochoa, 2017). En donde, se registró también el primer hallazgo de la especie *Planktothrix* sp., la cual se ha desarrollado en el transcurso de los años hasta convertirse en la especie más dominante del ecosistema acuático (Figura 5). Este cambio puede justificarse debido a que este ecosistema fue acumulándose de nutrientes propulsores para el crecimiento de cianobacterias como es *Planktothrix* sp, lo que la diferencia es que dicho género posee características tóxicas lo cual hace que desplace especies poco dominantes de microorganismos (Containing et al., 2021).

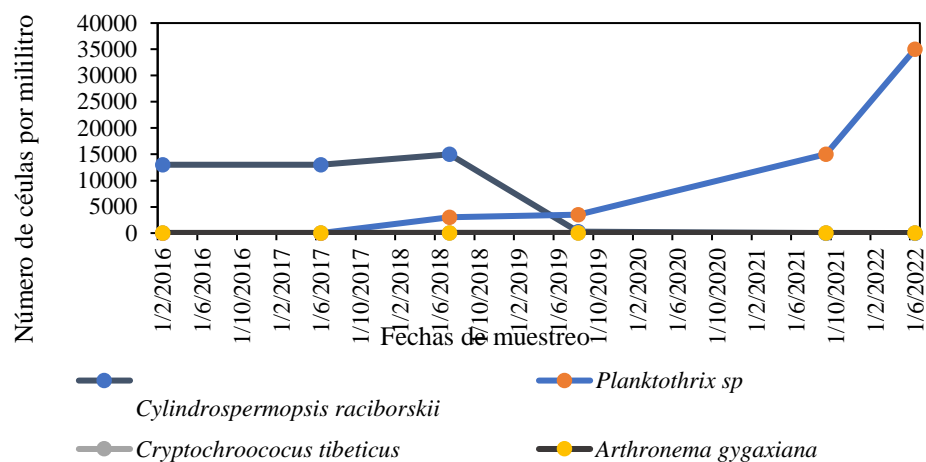


Figura 5. Análisis multitemporal de especies de cianobacterias de Yahuarcocha

4.2. Relación de la Calidad de Agua y la Presencia de Cianobacterias

Se obtuvo el análisis de la calidad de agua con base en la presencia de cianobacterias, donde se revisó los datos de las variables de biovolumen, clorofila y potenciales toxinas presentes de las cianobacterias, descritos en la tabla 5.

Se determinó que el género *Planktothrix* sp fue el más dominante en el ecosistema acuático con un biovolumen de 56 mm³/L. Por tanto, el lago fue establecido en el rango de alerta alta, para todas las especies presentes. De igual

forma, se calculó el número de células/mL, el tamaño celular promedio, clorofila, total de biovolumen y el porcentaje de biomasa ocupado en el ecosistema (Tabla 5). Se determinó que las cianobacterias ocupan el 97.9% de biomasa en el cuerpo de agua, al igual que se detallan las potenciales toxinas que pueden ser producidas (Tabla 6).

Tabla 66. Datos en base a muestreos de biovolumen

Muestras	Especie	N° Células/ml	Tamaño Celular (μm)	Clorofila ($\mu\text{g/l}$)	Biovolumen media/ especie	Biomasa Total (%)
YH1	<i>Planktothrix</i> sp.	35000	180.17	63.98	56 mm^3/L	97.3
YH2		34500	113.35	71.49		
YH3		37000	140.54	65.52		
YH4		31200	124.23	68.63		
YH5		35400	114.5	69.8		
YH6		35000	178.3	88.61		
YH1	<i>Cryptochroococcus</i> <i>tibeticus.</i>	2	0.5	77.34	5 mm^3/L	0.5
YH2		5	0.58	85.71		
YH3		4	0.53	86.94		
YH4		3	0.61	87.61		
YH5		1	0.57	87.23		
YH6		1	0.4	88.2		
YH1	<i>Arthronema</i> <i>gygaxiana</i>	1	0.5	77.34	1 mm^3/L	0.1
YH2		0	0	85.71		
YH3		0	0	86.94		
YH4		0	0	87.61		
YH5		0	0	87.23		
YH6		1	0.4	88.2		
Total % volumen fitoplanctónico						97.9

Se describieron las posibles toxinas que producirían cada especie identificada, así como las sustancias químicas que son secretadas y constan en la base de datos de fitoplancton MySQL. Según Li et al. (2001) en su biovolumen individual se puede identificar la cantidad de toxinas que serían producidas y liberadas en el ecosistema. Además, de que son causantes de efectos negativos en diversos organismos que interactúan en el entorno, al igual que los animales, microorganismos y el ser humano por las actividades recreativas (Tabla 6).

Oehrle (2017) mencionan que el acelerado crecimiento de cianobacterias o los denominados blooms, producen el afloramiento masivo y por ende eventos de toxicidad. Esto a causa de que varias de las especies tóxicas, en especial las estudiadas en el lago Yahuarcocha se encuentra *Planktothrix* sp. Las toxinas producidas son altamente dañinas por ejemplo las saxitoxinas y las anatoxinas son perjudiciales para organismos y para el funcionamiento del bioma ocasionando un desequilibrio (Van Colen et al., 2017).

Tabla 77. Especies potencialmente tóxicas y sus posibles toxinas

Espece	Toxinas	Compuestos químicos	Toxinas por biovolumen
<i>Planktothrix</i> sp.	Saxitoxinas, Anatoxina-a,	Péptidos cíclicos, Lipopolisacáridos (LPS)	10-20 ug/L ⁻¹
<i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	Microcistinas	Alcaloides, Lipopolisacáridos (LPS)	5-10 ug/L ⁻¹
<i>Arthronema gygaxiana</i>	Microcistinas, anatoxina-a, Anatoxina-a(s)	Aminoácido no Proteinogénico, Lipopolisacáridos (LPS)	2-5 ug/L ⁻¹

Fuente: (Basti et al., 2018)

4.2.1. Biovolumen de *Planktothrix* sp.

Esta especie se estableció como la más peligrosa por su adaptabilidad a ecosistemas templados y tropicales tal como lo refleja los resultados en lo que obtuvo los numero más altos. En el estudio se evidenció que hay una relación en la

cantidad de células presentes con la cantidad de clorofila. Se determinaron altos contenidos de nutrientes que son vertidos en Yahuarcocha, además que en el conteo celular se observó una cantidad excesiva de células/ml obteniendo una media de 35000 células/ml. En el análisis de biovolumen se obtuvo que la biomasa de esta especie fue de 56mm³/L, como se aprecia en la Figura 6. Esto corresponde al análisis de relación entre los parámetros estudiados para el biovolumen fitoplanctónico, en donde se observó que esta especie es la dominante en el ecosistema. Además, las condiciones para *Planktothrix* sp son más favorables, porque existe un incremento de la concentración de clorofila y nutrientes como nitrógeno y fosforo, lo cual favorecería a su proliferación. Sin embargo, es diferente para las otras especies debido a las condiciones de luminosidad y turbidez, que no permiten el desarrollo de colonias, ni blooms de cianobacterias como reporta Roset et al., (2001).

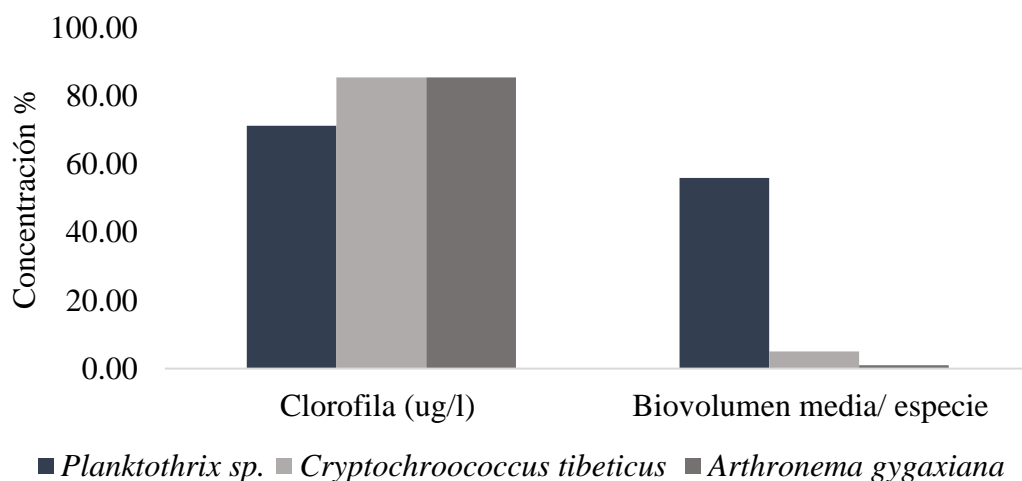


Figura 6. Relación de la concentración de clorofila y el biovolumen

4.2.2. Biovolumen de *Cryptochroococcus tibeticus*

Se determinó la presencia de esta especie en bajas densidades poblacionales, porque existe una especie dominante que la desplaza en la columna de agua. La media obtenida fue de 4 Cel/ml, en el análisis de biovolumen se determinó que tiene una biomasa de 5mm³/L. Aunque se ha evidenciado que existe una disminución de esta especie y un aislamiento poblacional debido a las condiciones mencionadas, por lo que disminuye su presencia en el ecosistema. Albrecht et al. (2017) menciona

que *Cryptochroococcus tibeticus* no suele desarrollar blooms debido a su limitado tamaño celular. En la Figura 7 se observó que existe una relación en las especies de cianobacterias, en su crecimiento celular y tamaño, por lo que facilita la formación de floraciones con mayor dominancia. Es decir, que mientras más células por especie existan esto les facilita distribuirse con mayor facilidad.

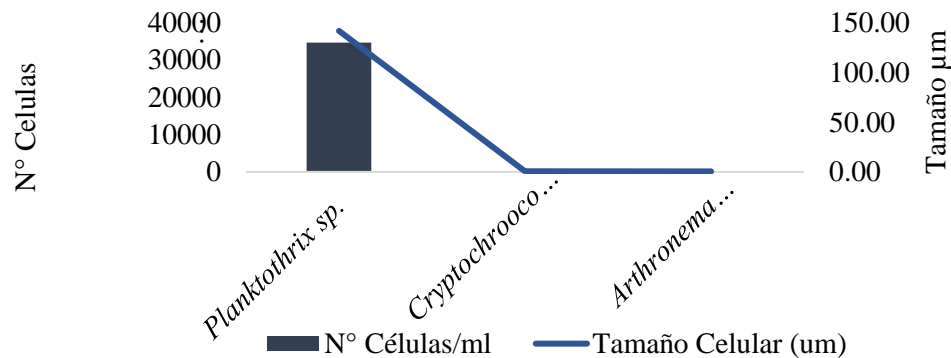


Figura 7. Relación del número de células por mililitro y el tamaño celular

4.2.3. Biovolumen de *Arthronema gygaxiana*

Se obtuvo como resultado que esta especie debido a su baja densidad poblacional el número de especies/ml fue de 1, un porcentaje muy bajo debido a las variables mencionadas, aislándola de las demás especies de fitoplancton y cianobacterias. Un factor importante es que, al existir un aislamiento de especies, estas crecen en condiciones desfavorables y solo están presentes en la columna de agua en 5 y 6 metros de profundidad. Dando así un resultado de $1\text{mm}^3/\text{L}$ siendo la especie con menor biomasa en el ecosistema y la más incapaz de formar floraciones (Cony et al., 2014).

4.2.4. Biovolumen Fitoplanctónico

El análisis de biovolumen se realizó tomando en cuenta las características de las cianobacterias presentes. Se obtuvo que la morfología de la laguna alberga una cantidad de biomasa alta, porque ocupa el mayor porcentaje de cianobacterias en el ecosistema acuático. La especie *Planktothrix* sp que contiene 35000 cel/ml con un biovolumen de $1\text{mm}^3/\text{L}$ y una concentración de clorofila de 68 ug/l, se

establece como la especie más dominante y con un Scum categoría III. Kurtz et al., (2021) menciona a *Planktothrix* sp como una especie que se desarrolla en ecosistemas templados y subtropicales, de agua dulce y con altos contenidos de nutrientes. Por lo tanto, es probable que Yahuarcocha se encuentre en un rango de alerta alto, dado que la laguna presenta características homogéneas (Tabla 7).

Tabla 88. Estadística descriptiva tabla resumen de biovolumen

Especie	Clorofila (ug/l)	Biovolumen media/ especie	Nº células/ml	Tamaño celular (µm)
<i>Planktothrix</i> sp.	71.34	56	34683	141.85
<i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	85.51	5	3	0.53
<i>Arthronema gygaxiana</i>	85.51	1	1	0.5

Las estaciones de muestreo (YH1, YHA2, YH3, YH4, YH5) presentan una relación proporcional y equitativa en un rango de biovolumen de 57 mm³/L y una concentración de clorofila de 76 ug/L. Esto se debe a las altas cantidades de nutrientes que ingresan al lago y favorecen el desarrollo de estas especies. A diferencia de la columna de agua en el punto YH6 donde se observó la disminución de la concentración de biovolumen fitoplanctónico. Aunque, la concentración de clorofila se mantenga, es debido a las condiciones de luminosidad, porque la turbidez del agua analizada con el disco secchi fue de 20 cm, existiendo poca disposición de luz es decir poblaciones aisladas y menor desarrolladas. En la Figura 8 se observa que el biovolumen para las diferentes estaciones de muestreo es similar y no existen variaciones significativas. Morales et al. (2017) mencionan que no es un factor limitante las propiedades fisicoquímicas en las cianobacterias debido a que almacenan nutrientes que les permite vivir en condiciones sin luminosidad. Es decir que, el espejo de agua de Yahuarcocha aunque este homogéneamente cubierto por floraciones de cianobacterias, la columna de agua puede presentar diferencias de poblaciones de cianobacterias, incluso con la poca luminosidad y presencia de nutrientes que necesitan para desarrollarse.

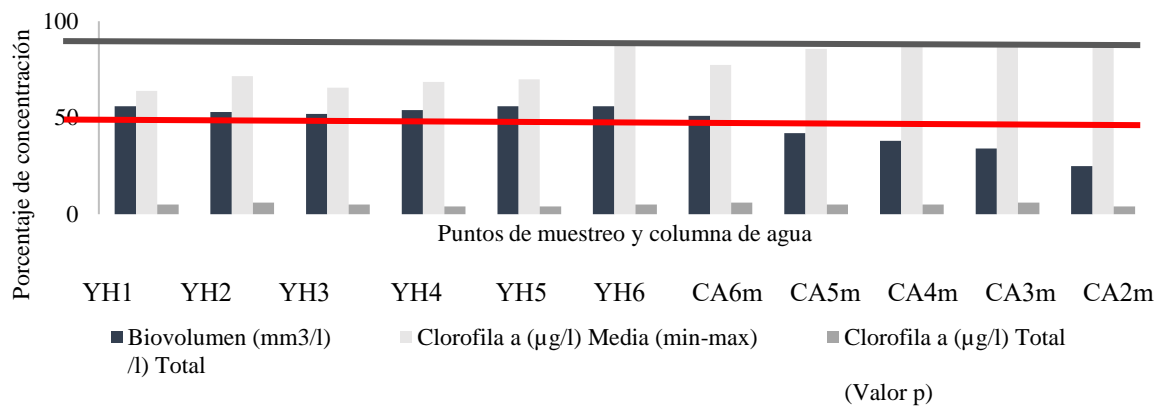


Figura 8. Biovolumen para las estaciones de muestreo y columna de agua

4.2.5. *Diseño del Protocolo para evaluar el riesgo en Yahuarcocha*

Se diseñó un protocolo que permita evaluar el estado de riesgo del lago basado en los parámetros admisibles que establece la UNESCO que está encargada de las actividades de uso recreativo, y la ONU que está basado en los parámetros de salud, debido a la alta cantidad de toxinas que pueden producir, en la Tabla 7 se evidencia los niveles a evaluar en un lago. Se estableció los niveles de riesgo basados en estos parámetros los cuales presentan el nivel de riesgo que existiría en relación con los parámetros que se analizó en este estudio.

Tabla 99. Protocolo para evaluar ecosistemas acuáticos y su nivel de riesgo por biomasa y biovolumen total

Nivel del riesgo	Descripción del riesgo	Límites permisibles
Bajo	Cianobacterias con biovolumen reducido, baja relación superficial y dimensión lineal, limitando la interacción ambiental, disminuyendo sus ventajas ecológicas para la persistencia en el sistema acuático	N° células: 10000 cel/ml Biovolumen: >1mm ³ /L Clorofila: 10 ug/L
Medio - bajo	Cianobacterias con biovolumen alto, baja relación superficial y dimensión lineal, no indican un riesgo inminente, pero puede favorecer una adecuada interacción con su medio o la captación lumínica necesaria que puedan beneficiar su proliferación.	N° células: 10000 cel/ml Biovolumen: >2 mm ³ /L Clorofila: 10 ug/L
Medio	Cianobacterias con biovolumen reducido, baja relación superficial y dimensión lineal, las variables ambientales pueden significar una importante ventaja ecológica para la proliferación de cianobacterias en el ecosistema.	N° células: 15000 cel/ml Biovolumen: 12 mm ³ /L Clorofila: 10 ug/L
Medio – alto	Cianobacterias con biovolumen reducido, baja relación superficial y alta dimensión lineal, tienen una importante ventaja ecológica para la captación lumínica y la evasión de organismos que tengan competencia de nutrientes.	N° células: 15000 cel/ml Biovolumen: >25 mm ³ /L Clorofila: 50 ug/L
Alto	Cianobacterias con biovolumen reducido, alta relación superficial y dimensión lineal, es el nivel de mayor alerta para el sistema acuático, debido a que poseen un intercambio efectivo de elementos necesarios para su proliferación, poseen grandes dimensiones y poblaciones que florecen más rápido, captan cantidades de luz necesarias para aumentar su biomasa y son dominantes sobre el ecosistema.	N° células: 20000 cel/ml Biovolumen: > 75mm ³ /L Clorofila: 50µg/L

Fuente: Propia

Con base al estudio realizado se determinó que existe una relación directamente proporcional de la clorofila y el biovolumen, es decir, que si aumenta

la clorofila también aumenta el biovolumen entre las especies de cianobacterias en especial *Planktothrix* sp. La cantidad de clorofila que presentó, se estima que fue por la alta abundancia de nutrientes que ingresan al cuerpo lacustre y que no son drenadas.

Esto debido a que el lago no presenta una desembocadura natural, dificultando el ciclo de nutrientes o reciclaje ecológico que favorece a los ecosistemas en su funcionamiento. Según Morales (2013) menciona una alta competencia de microorganismos tales como diatomeas y clorofitas que forman parte del ecosistema, junto con las cianobacterias, aunque las cianobacterias pueden aprovechar mejor las condiciones de biovolumen y clorofila sobre las otras especies de fitoplancton.

4.3. Estrategias de Control de Cianobacterias

Se tomó en cuenta realizar dos proyectos basados en los resultados obtenidos en esta investigación, que ayuden al control de las cianobacterias, enfocados en un proyecto de monitoreo del lago Yahuarcocha y proyecto de educación ambiental.

4.3.1. Proyecto de Monitoreo del lago Yahuarcocha

El monitoreo en lagos altoandinos deben ser una herramienta muy importante para la conservación de estos ecosistemas, al estar bajo una presión antrópica pueden provocar una aceleración en su eutrofización, por lo que este proyecto busca establecer un protocolo que permita evaluar periódicamente los cambios en el ecosistema lacustre.

Actividad 1. Establecer un monitoreo de campo

1. El muestreo comienza con la evaluación visual del área de estudio, acudiendo a los puntos establecidos como estaciones de muestreo, se debe tomar en cuenta color, formación de floraciones de cianobacterias (Natas superficiales)

2. Evaluar los parámetros fisicoquímicos con un Multiparámetro (pH, oxígeno disuelto, conductividad, turbidez, temperatura), luego utilizar el disco secchi en la columna de agua.

3. Para la toma de muestras se debe tomar en cuenta las normas de bioseguridad para evitar enfermedades por las toxinas de las cianobacterias, se debe utilizar botellas de color ámbar para que las muestras no se degraden, etiquetar las botellas y colocarlas en un cooler frío para transportarlas.

4. Los puntos de muestreo adecuados para un buen monitoreo están establecidos en la Figura 9, donde los puntos YH1, YH2, YH3, YH4, YH5 corresponden a las floraciones formadas en las orillas, el punto YH6 corresponde a la columna de agua donde debe tomarse a diferentes profundidades utilizando la botella muestreadora tipo Van Dorn.

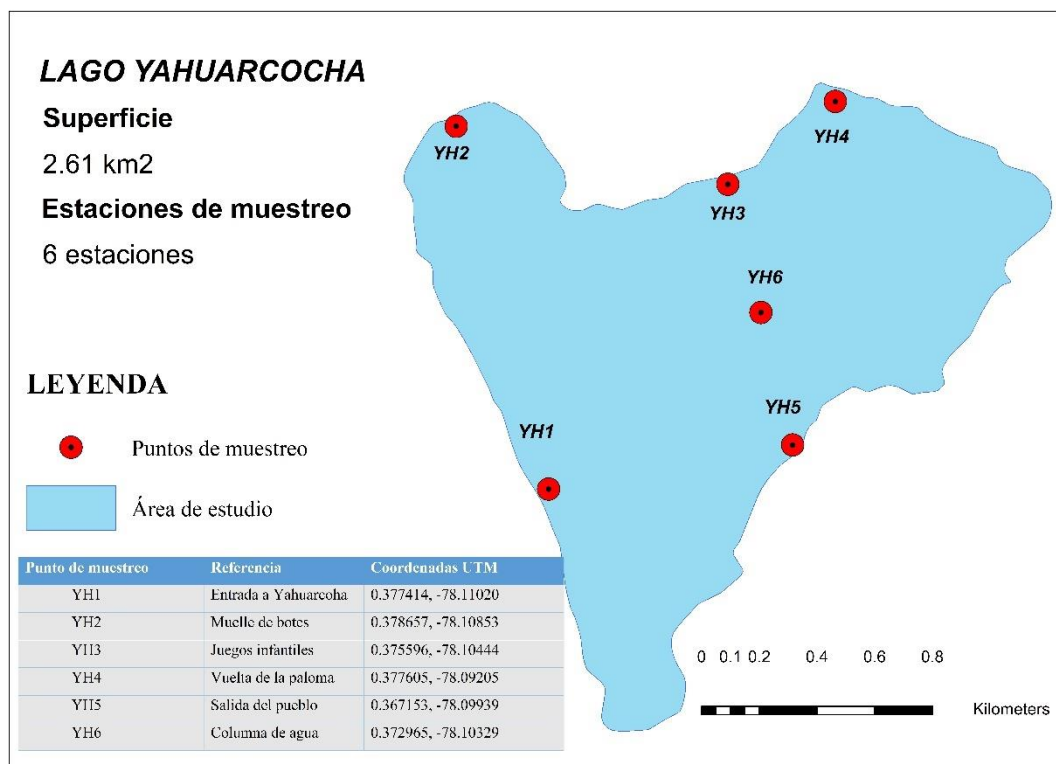


Figura 9. Puntos de muestreo para monitoreo de cianobacterias

Actividad 2. Trabajo de laboratorio, sobre las muestras tomadas

1. Visualizar y contabilizar cianobacterias, se debe utilizar muestras frescas del área de estudio, para poder analizarlas en un microscopio óptico, se deben prepara placas con los porta y cubreobjetos para analizar las especies presentes (Morfología, taxonomía).

2. En la cámara Sedgwick Rafter se debe colocar 1mL de muestra y dejar reposar por 40 minutos para que se sedimenten las muestras, en este paso se realiza el conteo de Células/mL para conocer el biovolumen de cianobacterias.

3. Colocar 50 mL de muestra en una jeringa de la misma capacidad, para filtrarlas por microfiltros de 12 um de diámetro y 40 um de porosidad, luego cortar los filtros y colocarlos en tubos de ensayo agregando 50 mL de metanol y dejar reposar durante 24 horas en refrigeración.

4. Una vez pasado el periodo de espera tomar 2 ml del tubo de ensayo y colocarlos en tubos eppendorf de la misma capacidad y centrifugarlos durante 15 minutos a 13000 rpm. Calcular la clorofila a, utilizando el fluorímetro y realizar 3 repeticiones y obtener un promedio.

Actividad 3. Publicación de información sobre las cianobacterias

Realizar un informe detallando las condiciones del lago: Parámetros fisicoquímicos, profundidad de visualización del disco secchi, especies presentes en el lago, conteo celular y concentración de clorofila, y estado de alerta del ecosistema. Socializar los resultados obtenidos mediante información descriptiva para la ciudadanía en general (Locales comerciales de Yahuarcocha, GAD Ibarra, y turistas del lago)

Tabla 1010. Matriz de actividades para establecer un protocolo para el monitoreo de Yahuarcocha

Objetivo: Elaborar un diseño de protocolo aplicable para lagos altoandinos para un seguimiento de control de las floraciones de cianobacterias que puedan representar un peligro para el ecosistema					
N°	Actividad	Recursos	Fecha de ejecución	Resultado	Responsables
1	Establecer un monitoreo de campo	Mapa de puntos de muestreo GPS Multiparámetro Botella muestreadora tipo Van Dorn Disco secchi Botellas color ámbar Cooler para transportar en frío	1 vez al mes Época seca 2 veces al mes Época lluviosa	Tener una base de datos de Yahuarcocha, para poder conocer el estado actual del lago e informar a la ciudadanía sobre los peligros del contacto con las cianobacterias	Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCA; GAD Ibarra; Comunidad de Yahuarcocha
2	Trabajo de laboratorio, sobre las muestras tomadas	Microscopio Porta y cubreobjetos Pipetas Pasteur Cámara Sedgwick Rafter	1 vez al mes Después de cada muestreo	Conocer los cambios que se producen en Yahuarcocha, y como cambia la dinámica de las cianobacterias (Morfología, especie dominante)	Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCA; GAD Ibarra
3	Publicación de información sobre las cianobacterias	Fichas descriptivas	1 vez cada 6 meses	Informar a la ciudadanía sobre los cambios producidos en Yahuarcocha, para poder realizar actividades recreativas sin riesgos producidos por las cianobacterias	Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCA; GAD Ibarra

4.3.2. Proyecto de educación ambiental

La importancia de la educación ambiental de lagos altoandinos busca dar a conocer posibles efectos que tienen los microorganismos como cianobacterias al momento de tener contacto con las personas y en el entorno, así concientizar a la ciudadanía sobre los efectos de las toxinas que desprenden las especies identificadas en el lago.

Se elaboraron fichas descriptivas, en el que se describan el contenido de la descripción morfológica, distribución espacial, toxinas producidas de las cianobacterias estudiadas, las mismas que se darán a conocer en GADs, instituciones educativas en la zona de influencia y realizar brigadas ambientales con estudiantes con estudiantes de últimos niveles.

Actividad 1. Contempla reuniones con los grupos de interés

1. Realizar reuniones con dueños de locales comerciales como restaurantes y turísticos o de recreación como dueños de botes a pedal y motos acuáticas, las cuales se apoyará de material como son fichas técnicas (figura 10) donde se describe el contenido de las mismas y a continuación estarán descritas en las figuras 11,12,13 las cuales constaran de información descriptiva de especies y también de un proyector para dar a conocer información adicional y explicar detalladamente el contenido de las fichas.

2. Esto se contempla realizar una vez por mes para así poder conseguir los resultados de que los comerciantes de diferentes sitios turísticos y comerciales poseerán información de las cianobacterias y posibles problemas que estas causan, los responsables de dicha ejecución sería el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCA; GAD Ibarra; Comunidad de Yahuarcocha.

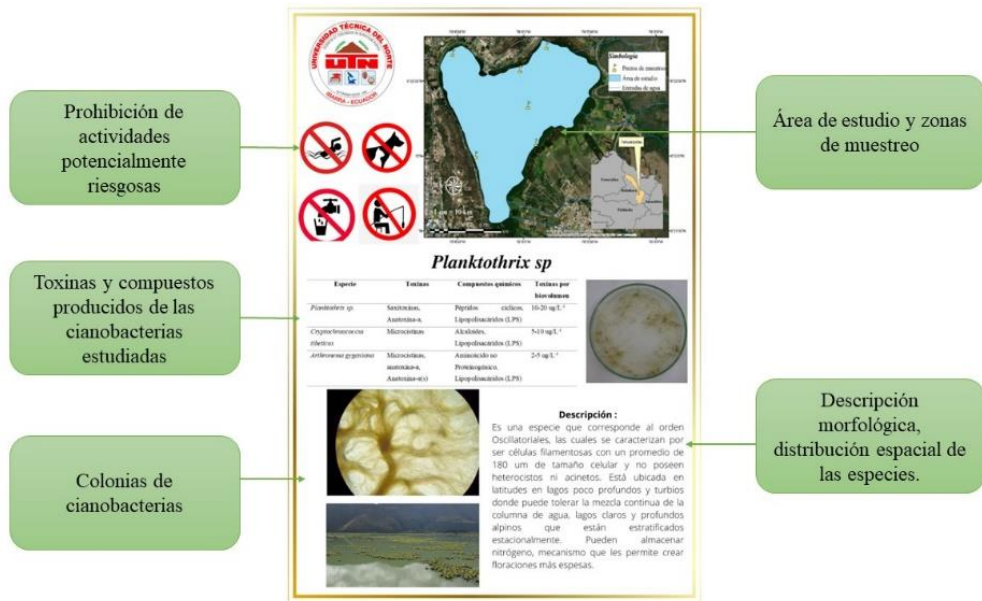


Figura 10. Estructura de fichas técnicas

Actividad 2. Cursos prácticos

1. Se contempla cursos prácticos los cuales se impartirán en unidades educativas y GADs sobre la importancia y cuidado contra especies de cianobacterias para lo cual se necesitará de fichas descriptivas, proyector y la visita a los lugares especificados,

2. Esto se lo realizara una vez por mes en unidades educativas y una vez cada tres meses en GADs, para así tener como resultados que estudiantes y profesionales conocerán la problemática causada por cianobacterias en el lago, los responsables de esto sería Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCA; GAD Ibarra; Comunidad de Yahuarcocha

Actividad 3. Sistema informativo

1. Se propondrá la creación de un sistema informativo sobre cianobacterias en los GADs para lo cual se necesitará de fichas descriptivas, laptops y bases de datos sobre las especies de cianobacterias

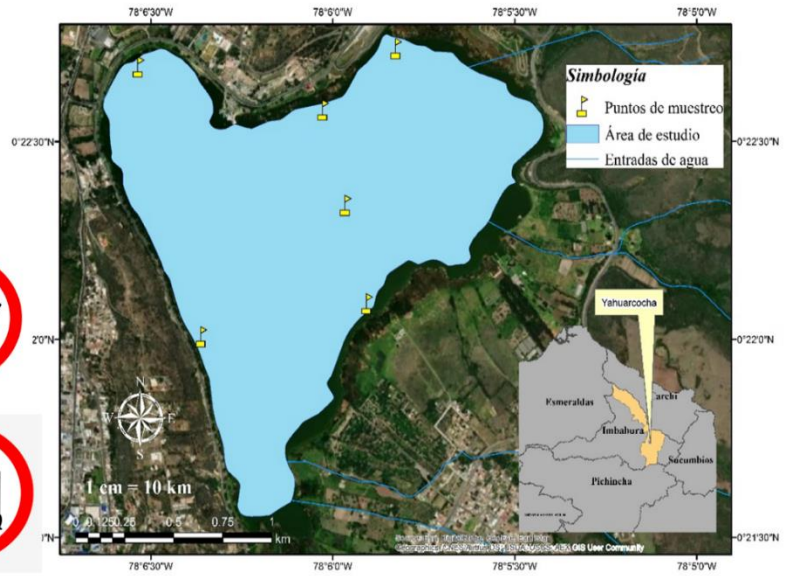
2. Esto se contempla realizarlo una vez por mes y el resultado es que las instituciones y personas naturales tendrán acceso a información clave sobre

especies de cianobacterias, de igual manera para conocer problemas que estas causan, los responsables de las actividades serian Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCA; GAD Ibarra; Comunidad de Yahuarcocha

3. Socialización con los sectores locales, en el caso de ser implementada la estrategia propuesta de educación ambiental, es de carácter obligatorio la socialización y la implementación de ordenanzas para la ciudadanía en general que visite Yahuarcocha, con la finalidad de evitar riesgos por las cianobacterias.

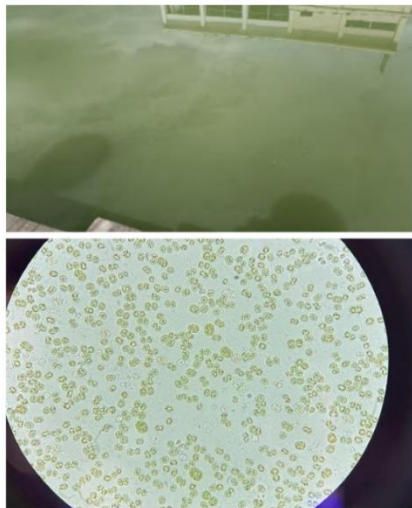


Figura 11. Ficha visual para la especie *Planktothrix sp*



Cryptochroococcus tibeticus

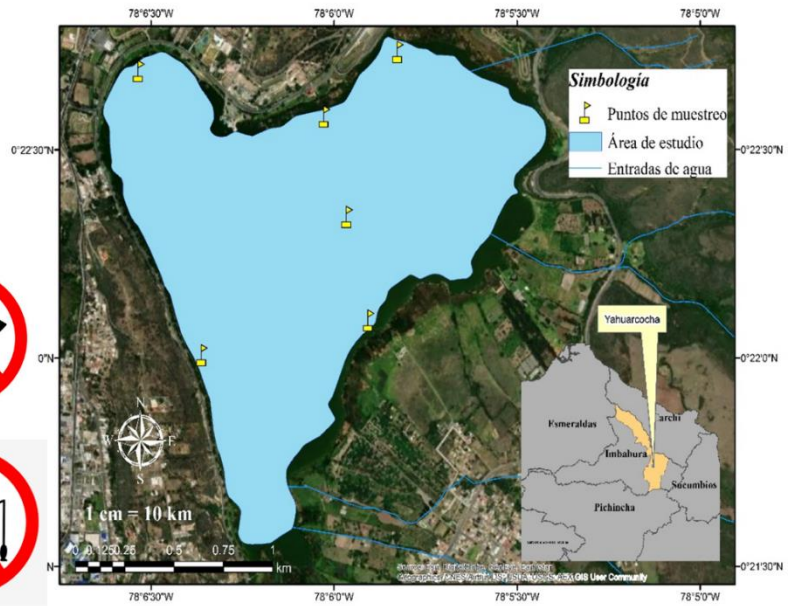
Especie	Toxinas	Compuestos químicos	Toxinas por biovolumen
<i>Planktothrix</i> sp.	Saxitoxinas, Anatoxina-a,	Péptidos cíclicos, Lipopolisacáridos (LPS)	10-20 ug/L ⁻¹
<i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	Microcistinas	Alcaloides, Lipopolisacáridos (LPS)	5-10 ug/L ⁻¹
<i>Arthronema gygaxiana</i>	Microcistinas, anatoxina-a, Anatoxina-a(s)	Aminoácido no Proteinogénico, Lipopolisacáridos (LPS)	2-5 ug/L ⁻¹



Descripción :

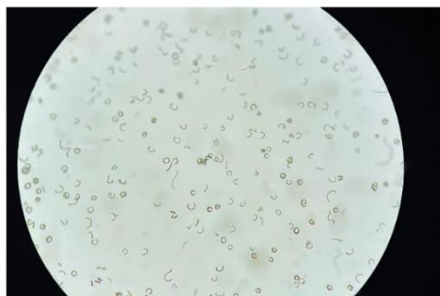
Esta especie corresponde al orden Chroococcales, esta caracterizado por ser células coloniales, unicelulares y forman floraciones y el tamaño celular es de 4 μm y de las colonias es de 30 μm , producen toxinas específicas que afectan al sistema hepático.

Figura 12. Ficha visual para la especie *Cryptochroococcus tibeticus*



Arthronema gygaxiana

Especie	Toxinas	Compuestos químicos	Toxinas por biovolumen
<i>Planktothrix sp.</i>	Saxitoxinas, Anatoxina-a,	Péptidos cíclicos, Lipopolisacáridos (LPS)	10-20 ug/L ⁻¹
<i>Cryptochroococcus tibeticus</i>	Microcistinas	Alcaloides, Lipopolisacáridos (LPS)	5-10 ug/L ⁻¹
<i>Arthronema gygaxiana</i>	Microcistinas, anatoxina-a, Anatoxina-a(s)	Aminoácido no Proteinogénico, Lipopolisacáridos (LPS)	2-5 ug/L ⁻¹



Descripción :

Esta especie corresponde al orden Nostocales, está caracterizada por ser células filamentosas y poseen heterocistos, su tamaño celular es de un promedio de 30 μm , pueden ser rectos, curvados o enrollados regular o irregularmente, producen toxinas tales como: anatoxinas, cylindrospermopsina, microcistinas, saxitoxinas.

Figura 13. Ficha visual para la especie *Arthronema gygaxiana*

Tabla 1111. Matriz de actividades estrategia para establecer un programa de educación ambiental en Yahuarcocha

Objetivo: Promover información a los grupos de interés sobre la importancia de la educación ambiental mediante fichas informativas					
N°	Actividad	Recursos	Fecha de ejecución	Resultado	Responsables
1	Reuniones con grupos de locales comerciales y turísticos	Fichas descriptivas, proyector,	1 vez por mes	Comerciantes tendrán información de problemas causados por cianobacterias	Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCa; GAD Ibarra; Comunidad de Yahuarcocha
2	Cursos prácticos en unidades educativas cercanas al área de influencia sobre la importancia y cuidado contra especies de cianobacterias	Fichas descriptivas, proyector,	1 vez por mes en unidades educativas 1 vez cada 3 meses en GAD Ibarra	Estudiantes conocerán acerca de problemas causados por cianobacterias	Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCa; GAD Ibarra; Comunidad de Yahuarcocha
3	Creación de un sistema informativo sobre cianobacterias en los GADs	Fichas descriptivas, laptops, bases de datos.	1 vez por mes	GAD, Unidades educativas conocerán datos de cianobacterias	Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica-PNCCa; GAD Ibarra; Comunidad de Yahuarcocha

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El análisis de las muestras ha dado a conocer la existencia de especímenes de cianobacterias tales como *Planktothrix* sp, *Cryptochroococcus tibeticus* y *Arthronema gygaxiana* las cuales tras realizar análisis de microscopía y técnicas moleculares por medio de la amplificación del gen 16s, se considera su presencia desde el año 2018 y estas han ido desarrollándose hasta ocupar la mayor parte del espejo de agua hasta la actualidad.

- El biovolumen fitoplanctónico determina que las especies *Planktothrix* sp, *Cryptochroococcus tibeticus* y *Arthronema gygaxiana*, son dominantes en el ecosistema, dado que el exceso de nutrientes ha generado su aumento desmedido. Esto se ve reflejado en la biomasa correspondiente a 97% que ocupan las floraciones de cianobacterias en Yahuarcocha, desembocando en estado hipereutrófico del lago.

- La propuesta de estrategias de control de Yahuarcocha contemplan monitoreos mensuales con el fin de evaluar con periodicidad los cambios que ocurran en el lago. Podría ser efectivo junto con la educación ambiental para fomentar el cuidado de los ecosistemas acuáticos y los riesgos que puede producir las actividades recreativas de contacto directo con el agua.

5.2. RECOMENDACIONES

- Los análisis moleculares se realizaron por medio de un estudio de secuencias de ADN específicas por los cual es recomendable el uso de ADN ambiental para así conocer especies que pueden existir en el cuerpo de agua, pero en menor densidad poblacional.

- Tras analizar el biovolumen fitoplanctónico se recomienda investigar sobre el aumento desmedido de nuevas especies de cianobacterias, en especial *Planktothrix* sp la cual posee un biovolumen del 97% del lago y sobrepasa los límites de mm³/L para actividades que se desarrollen en el lago, la cual se presume presenta un aumento desde el 2018, año en el cual han sido los primeros avistamientos.

- Utilizar nuevas metodologías para optimizar el tiempo de estudio de lagos que estén en estado de eutrofización como: ADN ambiental para estudiar más rápido las presencias de especies potencialmente tóxicas, y citometría para contar especies de manera eficiente y tomar medidas de mitigación antes de tener un florecimiento acelerado

REFERENCIAS

- Albrecht, M., Pröschold, T., & Schumann, R. (2017). Identification of Cyanobacteria in a eutrophic coastal lagoon on the Southern Baltic Coast. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00923>
- Alcántara, M., Jiménez, J., & Úrizar, E. (2020). Ecological, taxonomic and distributional aspects of benthic cyanobacteria in five streams of central Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 127. <https://doi.org/10.21829/ABM127.2020.1639>
- Ballejos, A., Fuel, A., Martínez, M., & Montenegro, J. (2017). *DETERMINACIÓN DEL ESTADO TRÓFICO DE LA LAGUNA DE YAMBO A TRAVÉS DE LA CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA “A.”*
- Basti, L., Hégaret, H., & Shumway, S. E. (2018). Harmful Algal Blooms and Shellfish. In *Harmful Algal Blooms*. <https://doi.org/10.1002/9781118994672.ch4>
- Bursztyn, A., Granito, M., & Rodríguez, P. (2022). *Revisión y optimización metodológica para extraer clorofila-a fitoplanctónica en ambientes acuáticos*. 1019–1028.
- Caicedo, F. (2016). *EVALUACIÓN DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DEL FITOPLANCTON CON RELACIÓN A LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL LAGO ALTOANDINO YAHUARCOCHA*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE.
- Carvalho, D., Pinto, V., Sousa, P., Magalhães, V., Fernández, E., Gomes, P., Minas, G., & Gonçalves, L. (2022). Methodology for Phytoplankton Taxonomic Group Identification towards the Development of a Lab-on-a-Chip. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/app12115376>
- Casamatta, D. A., Villanueva, C. D., Garvey, A. D., Stocks, H. S., Vaccarino, M., Dvořák, P., Hašler, P., & Johansen, J. R. (2020). *Reptodigitus Chapmanii* (Nostocales, Hapalosiphonaceae) Gen. Nov.: A Unique Nostoclean (Cyanobacteria) Genus Based on a Polyphasic Approach¹. *Journal of Phycology*, 56(2), 425–436. <https://doi.org/10.1111/jpy.12954>

- Chen, X., Yang, Y., Lu, Q., Sun, X., Wang, S., Li, Q., Wei, X., & Wang, Y. (2021). The influence of light intensity and organic content on cultivation of *Chlorella vulgaris* in sludge extracts diluted with BG11. *Aquaculture International*, 29(5), 2131–2144. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00740-3>
- Chin, T., Beecraft, L., & Wetz, M. S. (2022). Phytoplankton biomass and community composition in three Texas estuaries differing in freshwater inflow regime. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 277(February), 108059. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2022.108059>
- Containing, L., Zastepa, A., Miller, T. R., Watson, L. C., Kling, H., & Watson, S. B. (2021). in *Two Georgian Bay Embayments , Lake Huron*. 1–20.
- Cony, N., Ferrer, N., & Cáceres, E. (2014). Evolución Del Estado Trófico Y Estructura Del Fitoplancton De Un Lago Somero De La Región Pampeana: Laguna Sauce Grande (Pcia. de Buenos Aires, Argentina). *Biología Acuática*, 30, 79–91. <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/4168>
- Derot, J., Yajima, H., & Jacquet, S. (2020). Advances in forecasting harmful algal blooms using machine learning models: A case study with *Planktothrix rubescens* in Lake Geneva. *Harmful Algae*, 99(May), 101906. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101906>
- Galarza, A., & Perez, G. (2019). *DISEÑO DE HUMEDALES ARTIFICIALES PARA FITORREMEDIACIÓN DE PLOMO Y CROMO CON Typha latifolia EN EL LAGO YAHUARCOCHA-IMBABURA PLAN*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE FACULTAD.
- Geerling, W., & Magee, G. (2017). Co-Occurrence of Cyanobacteria and Cyanotoxins with Other Environmental Health Hazards: Impacts and Implications. *Studies in Economic History*, 167–186. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6008-3_7
- González, L., Pacheco, J., Yema, L., Levrini, P., Clemente, J., Crisci, C., Lagomarsino, J., Méndez, G., Fosalba, C., Goyenola, G., & Mazzeo, N. (2019). Drivers of cyanobacteria dominance, composition and nitrogen fixing behavior in a shallow lake with alternative regimes in time and space, Laguna del Sauce (Maldonado, Uruguay). *Hydrobiologia*, 829(1), 61–76. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3628-6>

- Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2020). Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein-based technofunctional food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(17), 2961–2989. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1672137>
- Haakonsson, S., Rodríguez, M., Carballo, C., Pérez, M., Arocena, R., & Bonilla, S. (2020). Predicting cyanobacterial biovolume from water temperature and conductivity using a Bayesian compound Poisson-Gamma model. *Water Research*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115710>
- Handsley, M., Kowal, E., Russell, L., & Weyrich, L. S. (2021). Researchers using environmental DNA must engage ethically with Indigenous communities. *Nature Ecology and Evolution*, 5(2), 146–148. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01351-6>
- Jácome, G., Valarezo, C., & Yoo, C. (2018). Assessment of water quality monitoring for the optimal sensor placement in lake Yahuarcocha using pattern recognition techniques and geographical information systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6639-x>
- Kurtz, T., Zeng, T., & Rosario-Ortiz, F. L. (2021). Photodegradation of cyanotoxins in surface waters. *Water Research*, 192, 116804. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116804>
- Li, H., Alsanea, A., Barber, M., & Goel, R. (2019). High-throughput DNA sequencing reveals the dominance of pico- and other filamentous cyanobacteria in an urban freshwater Lake. *Science of the Total Environment*, 661, 465–480. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.141>
- Li, R., Carmichae, W. W., Brittain, S., Eaglesham, G. K., Shaw, G. R., Liu, Y., & Watanabe, M. M. (2001). First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 37(6), 1121–1126. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01075.x>
- Mališová, E., Fašková, L., Pavúková, D., Híveš, J., & Benköová, M. (2021). Removal of cyanobacteria and cyanotoxins by ferrate from polluted lake

- water. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(21), 27084–27094. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12194-w>
- Mehinto, A., Smith, J., Wenger, E., Stanton, B., Linville, R., Brooks, B. W., Sutula, M. A., & Howard, M. D. A. (2021). Synthesis of ecotoxicological studies on cyanotoxins in freshwater habitats – Evaluating the basis for developing thresholds protective of aquatic life in the United States. *Science of the Total Environment*, 795, 148864. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148864>
- Mohsin Ibrahim, Z., & Abbas Buhlool, M. (2015). Study Aicoholic Extract Effecting of Orange Plant in the Growth of Two Types of Algae Microcystis Sp. & Chroococcus Sp. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences*, 3(9), 2321–8851.
- Morales, E., Martínez, R., & Suárez, G. (2017). Aislamiento, cultivo, viabilidad y evaluación de un consorcio cianobacteria-microalga como acondicionador de suelos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35(1–2), 51–71. <https://doi.org/10.26807/remcb.v35i1-2.249>
- Mosquera, P., Hampel, H., Vázquez, R., Alonso, M., & Catalan, J. (2017). Abundance and morphometry changes across the high-mountain lake-size gradient in the tropical Andes of Southern Ecuador. In *Water Resources Research* (Vol. 53, Issue 8, pp. 7269–7280). <https://doi.org/10.1002/2017WR020902>
- Mosquera, P. v., Hampel, H., Vázquez, R. F., & Catalan, J. (2022). Water chemistry variation in tropical high-mountain lakes on old volcanic bedrocks. In *Limnology and Oceanography* (Vol. 67, Issue 7, pp. 1522–1536). <https://doi.org/10.1002/lno.12099>
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3327–3332. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3327-3332.1997>
- Ochoa, M. (2017). *Evaluacion del crecimiento de cianobacterias en relacion a los parametros fisico-quimicos del agua en el lago de Yahuarcocha*.
- Oehrle, S., Rodriguez-Matos, M., Cartamil, M., Zavala, C., & Rein, K. S. (2017). Toxin composition of the 2016 *Microcystis aeruginosa* bloom in the St. Lucie

- Estuary, Florida. *Toxicon*, 138, 169–172.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.09.005>
- Palacio, K., Hernández, E., Peñuela, G., Aguirre, N., & Vélez, F. (2019). Características morfológicas de las cianobacterias y fitoplancton dominante en tres embalses de Antioquia: un enfoque basado en la forma y el biovolumen. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2).
<https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1306>
- Ponce, H. (2006). La matriz FODA : una alternativa para realizar diagnósticos y determinar estrategias de intervención en las organizaciones productivas y sociales. *Contribuciones a La Economía*, 16.
- Portilla, K. (2015a). *EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DEL AGUA, PARA DETERMINAR EL ESTADO TRÓFICO DEL LAGO YAHUARCOCHA, PROVINCIA IMBABURA*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE.
- Portilla, K. (2015b). *EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DEL AGUA, PARA DETERMINAR EL ESTADO TRÓFICO DEL LAGO YAHUARCOCHA, PROVINCIA IMBABURA* (p. 168).
- Rao, K., Zhang, X., Wang, M., Liu, J., Guo, W., Huang, G., & Xu, J. (2021). The relative importance of environmental factors in predicting phytoplankton shifting and cyanobacteria abundance in regulated shallow lakes. *Environmental Pollution*, 286(January), 117555.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117555>
- Riascos, L., Geerts, A. N., Oña, T., Goethals, P., Cevallos-Cevallos, J., vanden Berghe, W., Volckaert, F. A. M., Bonilla, J., Muylaert, K., Velarde, E., Boets, P., & van der heyden, C. (2018). DNA-based monitoring of the alien invasive North American crayfish *Procambarus clarkii* in Andean lakes (Ecuador). *Limnologica*, 70(March), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.02.002>
- Rolim, L., Santos, F., Chaves, L., Gonçalves, M., Freitas, J., Nascimento, A. L., Soares-Sobrinho, J., Albuquerque, M., Lima, M., & Rolim, P. (2020). Cyanobacterial Blooms in Lake Varese: Analysis and Characterization over Ten Years of Observations. In *Nature* (Vol. 388, pp. 539–547).

- Roset, J.; Aguayo, S.; Muñoz, M. J. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. *Revista de Toxicología*, 18(2), 65–71. <https://www.redalyc.org/html/919/91918202/>
- Saelens, P. (2015a). Ecological functioning of a eutrophic, high-altitude shallow lake in Ecuador, Laguna Yahuarcocha. *K.U. Leuven, Kulak*, 85.
- Saelens, P. (2015b). Ecological functioning of a eutrophic, high-altitude shallow lake in Ecuador, Laguna Yahuarcocha [K.U. Leuven]. In *K.U. Leuven, Kulak*. [http://scriptiebank.be/sites/default/files/webform/scriptie/Pauline Saelens THESIS_0.pdf](http://scriptiebank.be/sites/default/files/webform/scriptie/Pauline%20Saelens%20THESIS_0.pdf)
- Salcedo, E. (2019). *EVALUACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CROMO EN POBLACIONES DE Typha latifolia EN LA LAGUNA DE YAHUARCOCHA Trabajo*.
- Salomón, S., Rivera, C., & Zapata, Á. (2020). Cyanobacterial blooms in Colombia: state of knowledge and research needs in the face of global change. 44(171), 376–391.
- Sánchez-Cortez, J. L., Arredondo-García, M. C., Leyva-Aguilera, C., Ávila-Serrano, G., Figueroa-Beltrán, C., & Mata-Perelló, J. M. (2018). Participación comunitaria y percepción social en Latinoamérica: un futuro para las áreas protegidas y proyectos de geoparques. *Ambiente y Desarrollo*, 21(41), 61–77. <https://doi.org/10.11144/javeriana.ayd21-41.pcps>
- Sant'Anna, C. L. A., Teresade P. Werner, V. R., Dogo, C. R., & Rios, F. R. de C. (2008). Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, 126(May 2015), 251–265. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2008/0126-0251>
- Sharip, Z., Yusoff, F. M., Jusoh, J., & Jamin, A. (2019a). Comparative limnology of natural and man-made tropical lakes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 380(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/380/1/012019>
- Sharip, Z., Yusoff, F. M., Jusoh, J., & Jamin, A. (2019b). Comparative limnology of natural and man-made tropical lakes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 380(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/380/1/012019>

- Steinitz, M., López, C., Jacobsen, D., & Guerra, M. de L. (2020). History of limnology in Ecuador: a foundation for a growing field in the country. *Hydrobiologia*, 847(20), 4191–4206. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04291-1>
- Thu, N. K., Tanabe, Y., Matsuura, H., & Watanabe, M. M. (2020). Morphological, biochemical, and molecular characterization of *Oscillatoria kawamurae* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) isolated from different geographical regions. *Phycological Research*, 68(3), 216–226. <https://doi.org/10.1111/pre.12419>
- Tokodi, N., Drobac, D., Lazić, G., Petrović, T., Marinović, Z., Lujčić, J., Malešević, T. P., Meriluoto, J., & Svirčev, Z. (2018). Screening of cyanobacterial cultures originating from different environments for cyanotoxicity and cyanotoxins. *Toxicon*, 154(November 2017), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.09.001>
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., & Vargas, F. (2015). El Gen aRNR 16s en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- van Colen, W., Portilla, K., Oña, T., Wyseure, G., Goethals, P., Velarde, E., & Muylaert, K. (2017). Limnology of the neotropical high elevation shallow lake Yahuarcocha (Ecuador) and challenges for managing eutrophication using biomanipulation. *Limnologica*, 67(October), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.07.008>
- Wang, Y., Jia, N., Geng, R., Yu, G., & Li, R. (2021). Phylogenetic insights into chroococcus-like taxa (Chroococcales, Cyanobacteria), describing *Cryptochroococcus tibeticus* gen. nov. sp. nov. and *Limnococcus fonticola* sp. nov. from Qinghai-Tibet plateau. *Journal of Phycology*, 57(6), 1739–1748. <https://doi.org/10.1111/jpy.13205>
- Wejnerowski, Ł., Falfushynska, H., Horyn, O., Osypenko, I., Kokociński, M., Meriluoto, J., Jurczak, T., Poniedziałek, B., Pniewski, F., & Rzymiski, P. (2020). In vitro toxicological screening of stable and senescing cultures of aphanizomenon, planktothrix, and raphidiopsis. *Toxins*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/toxins12060400>

- Yao, J., Wang, G., Xue, B., Wang, P., Hao, F., Xie, G., & Peng, Y. (2019). Assessment of lake eutrophication using a novel multidimensional similarity cloud model. *Journal of Environmental Management*, 248(July), 109259. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109259>
- Zhang, H., Huo, S., Yeager, K. M., & Wu, F. (2021). Sedimentary DNA record of eukaryotic algal and cyanobacterial communities in a shallow Lake driven by human activities and climate change. *Science of the Total Environment*, 753, 141985. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141985>

ANEXOS

Anexo1: Medio de cultivo BG11

Para la realización del medio de cultivo BG11:

Stock1: Utilizar EDTA (tritríplex) di sódico 0.1 g/l; citrato férrico de amonio 0.6 g/l; Ácido cítrico 0.6g/l; cloruro de calcio 3.6g/l

Stock 2: sulfato de magnesio heptahidratado 7.5g/l

Stock 3: fosfato monohidrógeno di potásico 3.05g/l

Stock 4: ácido bórico 2.86g/l; cloruro de manganeso tetrahidratado 1.82 g/l; sulfato de zinc heptahidratado 0.222 g/l; sulfato de cobre pentahidratado 0.079 g/l; cloruro de cobalto hexahidratado 0.05 g/l; molibdeno de sodio dihidratado 0.391 g/l.

Por cada litro de medio BG11 agregar:

Stock 1: 10ml

Stock 2: 10ml

Stock 3: 10ml

Stock 4: 1ml

Ajustar el pH a 7.5 y auto clavar, así al final el pH queda al 7.1 aproximadamente.

Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN

Protocolo de extracción de ADN de cianobacterias

- Se tomo una colonia bacteriana de un cultivo puro y se resuspendio en 200ul de agua ultrapura en tubos eppendorf de 2ml.
- Posteriormente se añadió 200ul de buffer de extracción de ADN y 4ul de proteinasa k, se aplicó un vórtex por 5 minutos.
- Se agrego una perla se cerámica estéril para facilitar la ruptura de los componentes celulares.
- Se incubo a 65°C en un baño maría por 30 minutos y se aplicó cada 10 minutos un vórtex de 5 segundos para producir una correcta lisis celular.
- Las muestras reposaron a temperatura ambiente por 3 minutos y fueron incubadas a -10°C por 5 minutos.
- Posteriormente fueron incubadas a 37°C en un termoblok por 30 minutos, esto con la finalidad de activar la RNasa contenida en el buffer de extracción de ADN.

- Se añadió 160ul de MPC (reactivo para precipitar proteínas), se aplicó un vórtex por 10 segundos y se centrifugo a 13000 rpm a 4°C por 10 minutos, luego el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 2ml.
- Se añadió 300ul de isopropanol frío, los tubos fueron agitados por inversión 40 veces y se centrifugo a 13000 rpm a 4°C por 1 minuto y se obtuvo el pelet de ADN y se descartó cuidadosamente el isopropanol con una pipeta.
- Se añadió 300ul de etanol frío al 70% para lavar el pelet de ADN, se realizó agitación manual por inversión 40 veces y se centrifugo a 13000 rpm a 4°C por 1 minuto.
- Se descarto cuidadosamente el etanol y se repitió el lavado de estas agregando etanol.
- Se descarto el etanol al 70% y el pelet de ADN fue incubado en un termoblok a 50°C por 15 minutos para eliminar los restos de etanol.
- Finalmente se añadió 60ul de agua ultrapura y se guardaron las muestras de ADN a -10°C.

Anexo 3: Arboles filogenéticos

Arboles filogenéticos de cianobacterias de Yahuarcocha, en relación a las secuencias del gen ARNr 16S de la base datos GenBank y cepas de cianobacterias estudiadas. Se construyó en función del método Neighbor-Joinig, los números en cada nodo representan los valores de soporte del Bootstrap de 1000 réplicas. La secuencia del gen SR31 de *Puiccinia chunjie* (NR111548.1) fue usada como una secuencia fuera del grupo de cianobacterias.

