UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA: INGENÍERIA AGROPECUARIA

Tesis previa a la obtención del Título de:
INGENIERO AGROPECUARIO

TEMA: RELACIÓN SIMBIÓTICA DE *AZOLLA* (*Azolla caroliniana, A. filiculoides, A. mexicana*) – *ANABAENA* (*Anabaena azollae)* PARA LA PRODUCIÓN DE NITRÓGENO EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DE LA ZONA DE CAYAMBE, 2010.

AUTOR:
RICARDO JOSÉ CABEZAS MONTEROS

DIRECTOR:
ING. VALDANO TAFUR

Cayambe, Diciembre del 2011

Cayambe, 23 de Febrero del 2011

Declaratoria de responsabilidad

Yo, **Ricardo José Cabezas Monteros**, con cédula de ciudadanía #**171381666-6**, declaro voluntariamente ser autor de la tesis de grado previa a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario con el tema: "**RELACIÓN SIMBIÓTICA DE *AZOLLA* (*Azolla caroliniana, A. filiculoides, A. mexicana*) – *ANABAENA* (*Anabaena azollae)* PARA LA PRODUCIÓN DE NITRÓGENO EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DE LA ZONA DE CAYAMBE, 2010.**"

Razón por la que, los conceptos desarrollados, análisis realizados y conclusiones del presente trabajo son de mi responsabilidad como autor del presente trabajo.

Implementación

Ricardo José Cabezas Monteros
CI.171381666-6

Dedicatoria y Agradecimientos:

Un agradecimiento especial a la III Convocatoria a fondos concursables de la Universidad Politécnica Salesiana, a mis padres, hermanos y a mi comunidad "Santa Rosa de La Compañía" quienes contribuyeron para la realización de la presente investigación.

"El mejor, más eficiente y confiable indicador de que una población se mantenga próspera, es el hecho de que sus miembros logren adaptabilidad a las condiciones que el medio presente, mediante el razonable uso de los recursos que los beneficiarios y el sector posean."

A todos ellos, gracias.

INDICE DE CONTENIDOS.

Dedicatoria y Agradecimientos: 3

x. INDICE DE TABLAS 6

xi. INDICE DE IMÁGENES: 7

xii. INDICE DE ANEXOS: 9

1. INTRODUCCIÓN. 10

2. OBJETIVOS: 12

2.1.1 Objetivo General. 12

2.1.2 Objetivos Específicos. 12

3. MARCO TEÓRICO 13

3.1 Azolla spp. 13

3.2 Generalidades de las especies de *Azolla*. 13

3.2.1 Ontogenia de las especies de *Azolla* 13

3.2.2 Composición Química de *Azolla.* 13

3.2.3 Fertilización 14

3.2.4 Producción y ventajas 15

3.2.5 Usos 15

3.2.6 Plagas y enfermedades 16

3.3 Generalidades de las Cianobacterias. 17

3.4 Embriología 18

3.5 Simbiosis, fuente de innovación evolutiva. 19

3.5.1 Simbiosis de *Azolla-Anabaena (AA)* 19

3.5.2 Fijación de nitrógeno por parte de *Anabaena azollae.* 21

3.6 Identificación del material vegetal: 22

3.6.1 Taxonomía de *Azolla.* 23

3.7 Condiciones Medioambientales 24

3.8 Nitrógeno como fertilizante. 25

3.8.1 Ciclo del Nitrógeno (Transformaciones que intervienen) 27

3.8.2 Bacterias que intervienen en el ciclo del Nitrógeno. 28

3.8.3 Nitrificación (Mineralización). 28

3.9 Constante de Velocidad de Crecimiento Vegetal. 29

3.10 Ley de Shatellier 30

3.11 Física cuántica en relación al tipo de nitrógeno disponible 30

4. CARACTERÍSTICAS DEL SITIO EXPERIMENTAL 32

4.1 Ubicación Político Territorial 32

4.2 Ubicación Geográfica 32

4.3 Condiciones Medioambientales (nov. 2010 – feb. 2011) 32

5. MATERIALES Y MÉTODOS 33

5.1 Materiales 33

5.1.1 Material Biológico: 33

5.1.2 Material de laboratorio 33

5.1.3 Reactivos 34

5.1.4 Equipos de laboratorio 34
5.1.5 Material de campo 34
5.1.6 Material de oficina 34

5.2 Métodos 35
5.2.1 Diseño Experimental 35
5.2.2 Tratamientos 36

5.3 Característica de la Unidad Experimental. 37

5.4 Variables 37
5.4.1 Biomasa de *Azolla*. 37
5.4.2 Nitrógeno fijo en el agua: 37
5.4.3 Nitrógeno fijo en la planta: 37

5.5 Análisis funcional 38

5.6 Croquis del ensayo 38
6. MANEJO ESPECÍFICO DEL ENSAYO 39

6.1 Preparación del ensayo 39
6.1.1 Soportería para las bandejas. 39
6.1.2 Establecimiento de la cubierta de protección. 39
6.1.3 Material biológico. 39
6.1.4 Sustrato Acuoso. 40
6.1.5 Sistema de Recirculación de Agua. 40
6.1.6 Establecimiento de la Unidad Experimental 40
6.1.7 Crecimiento de *Azolla* 40
6.1.8 Extracción de Muestra Acuosa para análisis de laboratorio. 41
6.1.9 Análisis de Laboratorio. 42
6.1.10 Manejo de Desechos 45

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 46
6.2.1 Toma de Muestra acuosa para cuantificar los parámetros químicos y biológicos del agua de cultivo de *Azolla*. 46
Ensayo N#. 1 46
6.2.2 Toma de Muestras vegetales para cuantificar el crecimiento de *Azolla*. 48
Ensayo N#. 2 48
6.2.3 Toma de Muestra vegetal para el correspondiente análisis proximal de *Azolla*... 50
Ensayo N#. 3 50
6.2.4 Toma de Muestra acuosa para el análisis de Nitritos NO^-_2 correspondiente al medio de cultivo de *Azolla*. 51
Ensayo N#. 4 51
6.2.5 Toma de Muestra acuosa para el análisis de Nitratos NO^-_3 correspondiente al medio de cultivo de *Azolla*. 56
Ensayo N#. 5 56
7. CONCLUSIONES 63
8. RECOMENDACIONES 64
9. RESUMEN 66
10. BIBLIOGRFÍA 67
11. ANEXOS. 70

x. INDICE DE TABLAS

Tabla 5. *Azolla*: Composición Química (I) 14
Tabla 6. *Azolla*: Composición Química (II) 14
Tabla 1. *Fijación* de nitrógeno de asociaciones simbióticas entre algas cianofíceas y plantas. 21
Tabla 2. Microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en *Azolla.* 22
Tabla 3. *Azolla*: Taxonomía 24
Tabla 4. *Anabaena azollae*: Taxonomía 24
Tabla 7. ADEVA para cantidad de Nitrito NO^-_2 y de Nitrato NO^-_3. 35
Tabla 8. Codificación de los Tratamientos para Nitritos NO^-_2 y Nitratos NO^-_3. 36
Tabla 9. Croquis del ensayo e identificación para tratamientos y repeticiones. 38
Tabla 10. Codificación para tratamientos y dosis utilizadas 38
Tabla 11 Nitritos NO^-_2: Protocolo para análisis de laboratorio. 42
Tabla 12. Nitritos NO^-_2: Protocolo para análisis de laboratorio. 43
Tabla 13. Parámetros analizados y métodos utilizados en el Análisis Proximal. 44
Tabla 14. Métodos para análisis químico realizado a las especies de helechos *Azolla* 45
Tabla 15. Parámetros Físicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla*. Santa Rosa de la Compañía / 2011. 46
Tabla 16. Parámetros químicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla*. Santa Rosa de la Compañía / 2011. 47
Tabla 17. Parámetros Microbiológicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla*. Santa Rosa de la Compañía / 2011. 47
Tabla 18. Resultados: Crecimiento de *Azolla.* 49
Tabla 19. Parámetros Biológicos correspondientes al análisis proximal de una muestra vegetal de de *Azolla* Santa Rosa de la Compañía / 2011. 50
Tabla 20. Miligramos de Nitrito fijado por litro de agua de cultivo. 52
Tabla 21. Miligramos de Nitrito fijado por litro de agua de cultivo. 52
Tabla 22. ADEVA para miligramos de Nitrógeno atmosférico NO^-_2. 53
Tabla 23. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrito. 54
Tabla 24. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrito fijado por litro de agua de cultivo (mg. NO^-_2/L) en la evaluación de 3 especies del helecho acuático *Azolla.* 54
Tabla 25. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrito. 55
Tabla 26. Prueba de Tukey al 5% para el factorial Agua con *Azolla* Vs. Agua sin *Azolla.* 55
Tabla 27. Miligramos de Nitrato fijado por litro de agua de cultivo. 57
Tabla 28. Miligramos de Nitrato fijado por litro de agua de cultivo. 57
Tabla 29. ADEVA para miligramos de Nitrato NO^-_3. 58
Tabla 30. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrato. 59
Tabla 31. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrato. 59
Tabla 32. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrato. 60
Tabla 33. Prueba de Tukey al 5% para el factorial Agua con *Azolla* Vs. Agua sin *Azolla.* 61

xi. INDICE DE IMÁGENES:

Imagen 1. ***Azolla filiculoides*** (PEREIRA; RITA; PAZ; CARRAPIÇO, 2010) 13
Imagen 2. Helecho *Azolla* cubriendo totalmente, formando una verdadera alfombra. (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984). 16
Imagen 3. El helecho *Azolla* visto bajo la lupa, en sus foliolos se encuentra el alga *Anabaena Azollae*, fijadora de nitrógeno (x 12). (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984). 16
Imagen 4. *Anabaena azollae*: Heterocistos (a); Célula vegetativa (b); Nódulos Polares (c); *Azolla filiculoides*: Trichomas (Responsables del intercambio metabólico) (d). (PEREIRA; RITA; PAZ; CARRAPIÇO, 2010) 18
Imagen 5. Ciclo de vida de las especies de *Azolla*, donde se esquematiza la presencia de la cianobacteria (cyanob) durante todo el ciclo de vida del helecho. (CARRAPIÇO, 2010). 20
Imagen 6. *Azolla*: a) Órgano reproductivo masculino mostrando; los gloquidios con menos de tres septas sobre la másula del esporangio. b) Órgano reproductor femenino. Textura punteada del megaesporodermo. (ESPINOZA; GUTIERREZ, 2003). 23
Imagen 7. Distribución de nitrógeno (N) en la Tierra. 26
Imagen 8. Ciclo simplificado del nitrógeno en la Naturaleza. (Rodríguez, C., Sevillano, F. Y Subramaniam P., 1984). 27
Imagen 9. Mapa de la Comunidad: Santa Rosa de la Compañía, Sector "Las 4 Esquinas" (Plan de manejo de los Páramos de la UNOPAC, 2008.)..... 32
Imagen 10. Modelo de recirculación de agua. 45
Imagen 11. Distintivo que representa el trabajo que lleva a cabo la ESPOL con el financiamiento del Banco Mundial. 75
Imagen 12. Visita y recolección de muestras al Azolario de la ESPOL ubicado en el cantón San Borondón-Guayas 75
Imagen 13. Visita al proyecto Azolla Abono Verde /Guayaquil 75
Imagen 14. Forma en la que se deben recolectar las muestras desde el plantel-vivero… 75
Imagen 15. Procedimiento para conservar las muestras durante el viaje de regreso de 10 horas a Cayambe 75
Imagen 16. Uso de papel periódico húmedo, con motivo de conservar la humedad de la muestra vegetal recolectada 75
Imagen 17. Localización de Muestras en la comunidad de Paquiestancia. 75
Imagen 18. Localización de Muestras en el sector de rural cercano a Cayambe 75
Imagen 19. Localización de Muestras en la laguna de San Pablo 75
Imagen 20. Comparación óptica de los diferentes sitios de recolección dentro de la zona de influencia de Cayambe 75
Imagen 21. Comparación óptica de tamaños 75
Imagen 22. Proceso de adaptación y reproducción del material vegetal madre. 75
Imagen 23. Finalmente se concluyó que el uso de envases transparentes permite de mejor manera el paso de luminosidad, contribuyendo al desarrollo del simbionte. 75
Imagen 24. Uso de diferentes técnicas y envases para la reproducción vegetal. 75
Imagen 25. Análisis de condiciones previas a la instalación del experimento en campo 75
Imagen 26. Control de desarrollo de las tres especies de Azolla recolectadas en la zona. 75

Imagen 27. Instrumentos de medición de temperatura máxima, mínima y humedad. 75
Imagen 28. Prueba de primer Bosquejo del diseño a implementar desde la teoría a la práctica. 75
Imagen 29. Análisis de la reacción a partir de la adición de reactivo a la muestra, con motivo de cuantificar la existencia de nitrógeno en el agua. 75
Imagen 30. Adición de reactivo a la muestra de agua tomada en el sitio de desarrollo del material vegetal. 75
Imagen 31. Pipeteo para el análisis de una nueva muestra de agua..... 75

xii. INDICE DE ANEXOS:

Referencia 1. Cronograma de Ejecución: Relación Simbiótica de *Azolla-Anabaena.* 70
Referencia 2. PRESUPUESTO: Relación Simbiótica de *Azolla-Anabaena.* 71
Referencia 3. Formato de registro para toma de datos: 72
Referencia 4. Estadística Climatológica: Ecuador, Febrero 2011 73
Referencia 5. Condiciones Climatológicas para Noviembre del 2010. 74

1. INTRODUCCIÓN.

Los masivos informes difundidos a través de los medios de comunicación nacional e internacional respecto de un helecho acuático en la cuenca del río Guayas, con la capacidad de fijar macro elementos (nitrógeno) en el agua de cultivo, llegando incluso a reemplazar totalmente la fertilización química (urea) utilizada en el cultivo de arroz con proyección a ser masificada en la zona; llamo la atención como tema de investigación a ser replicado en el cantón Cayambe con las características propias que aquí se disponen (agua de riego almacenada en reservorios).

Características como el hecho, de ser nuestro cantón un referente en producir variedad de productos de consumo nacional, así los lácteos y desde hace algunas décadas atrás cultivos de exportación como las rosas.

La optimización de estas actividades han incrementado los sitios de acumulación de agua, de tal manera que permitan mantener el riego permanente durante todo el año. Es allí donde la presencia de este helecho acuático del género *Azolla* en los reservorios de agua del cantón hacen presumir la efectiva aplicabilidad de lo experimentado en la cuenca del río Guayas, considerando las condiciones existentes en los ecosistemas acuáticos del cantón Cayambe, y sus cultivos predominantes.

Adicionalmente se conoce que dos son los métodos más utilizados para fijar nitrógeno atmosférico (N_2) en la corteza terrestre. El comercial llamado método de Haber-Bosch que consiste en romper la molécula diatómica de N_2 en dos moléculas de amoniaco (NH^+_3), empleando altos costos. Y el método biológico llamado fijación biológica de nitrógeno (FBN) que opera en forma más sutil a temperatura ambiente, presión parcial y bajo costo (*Medicago sativa L.*), todo esto gracias a la acción combinada del complejo enzimático denominado nitrogenasa. (Montaño, 2010).

En consecuencia; la aplicación de fertilizantes químicos de manera desmedida, no puede ser una opción sostenible para el cantón Cayambe, ya que los precios de los insumos nitrogenados son elevados, producen dependencia al suelo, desnaturalización (erosión) y posterior contaminación de los mantos acuíferos.

Por lo tanto; es sumamente importante adaptar, evaluar y cuantificar el cultivo de *Azolla-Anabaena* que es una asociación simbiótica de mutuo beneficio, formada por el helecho acuático del género *Azolla*, que aloja en sus hojas una cianobacteria, *Anabaena azollae* (Handi, 1985). Bajo las condiciones y ecosistemas acuáticos presentes en el cantón, considerando que, el agua almacenada en los reservorios y que también sirvió de medio de cultivo para el helecho; acumuló nitrógeno. Y este será distribuido a través de los sistemas de riego para fertilizar los cultivos reduciendo con ello el desmedido, inadecuado y dañino uso de nitrógeno a partir de la urea y demás agroquímicos, por conocerse que ésta repercute en la salud del suelo, del agua y de los seres vivos.

Es así que la presente investigación muestra la evaluación de 3 diferentes especies del helecho acuático *Azolla* en relación con la fijación de nitrógeno atmosférico en forma de nitritos (NO^-_2) y nitratos (NO^-_3) que sucede en el agua de cultivo de este helecho, su crecimiento y productividad en los ecosistemas acuáticos de la zona de Cayambe.

Considerando todos estos aspectos, se podría deducir la potencialidad de los recursos nitrogenados puestos a disposición de las diferentes actividades biológicas implícitas en el cultivo de *Azolla*.

2. OBJETIVOS:

2.1.1 **Objetivo General.**

Evaluar la capacidad para captar nitrógeno en la relación simbiótica de *Azolla-Anabaena* (*AA*) con propósitos agrícolas en las condiciones ambientales de Cayambe.

2.1.2 **Objetivos Específicos.**

- Cultivar el simbionte *Azolla-Anabaena* (*AA*), en ecosistemas acuáticos de la zona.

- Valorar la producción de las distintas especies de *Azolla* (t/ha/día), respecto a los parámetros de (Temperatura, Humedad, pH, luminosidad, velocidad del viento), predominante en ecosistemas acuáticos de la zona.

- Cuantificar la fijación de nitrógeno a través de las especies químicas NO_2^- (mg/l), (mg/kg) y NO_3^- (mg/l), (mg/kg). Para ecosistemas acuáticos y terrestres respectivamente.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 *Azolla* spp.

3.2 Generalidades de las especies de *Azolla*.

3.2.1 Ontogenia de las especies de *Azolla*

Originaria de América del Norte y Centroamérica. Se ha introducido en zonas tropicales y está presente también en Europa, Asia y África, (Las Eras, 2006).

El diámetro de las especies de *Azolla* es pequeño, variando de 1 a 2,5 cm. (Las Eras, 2006).

Las hojas de *Azolla* son de forma triangular o poligonal, compuesto por multitud de hojas pequeñas (frondes) divididas flotan horizontalmente en la superficie del agua, su color oscila entre rojo y púrpura a pleno sol y de verde pálido a verde azulado en las zonas de sombra. (Las Eras, 2006), (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984).

Consta de tallos profusamente ramificados, recubiertos de hojas bilobuladas alternas, cada una de las cuales consta de un lóbulo ventral aclorofílico sumergido y otro lóbulo dorsal clorofílico que contiene cavidades con el alga Anabaena. Cuenta con raíces autenticas que surgen de forma endógena con pelos radicales. Presenta esporocarpos que se forman en grupos de dos o cuatro en la axila del lóbulo dorsal de la hoja basal de cada rama. (Las Eras, 2006), (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984).

Imagen 1. ***Azolla filiculoides*** (PEREIRA; RITA; PAZ; CARRAPIÇO, 2010)

3.2.2 Composición Química de *Azolla.*

La composición química de la célula está basada en carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P) y agua (H2O). La célula tiene su propio metabolismo, obtiene materia y energía del ambiente, mantiene un equilibrio interior, se reproduce, desarrolla y se adapta al ambiente. (PEREIRA; RITA; PAZ; CARRAPIÇO, 2010).

La composición química de *Azolla* como muestra vegetal (en relación a peso seco) de acuerdo a los análisis realizados en la Escuela Superior Politécnica del Litoral ESPOL-ICQ. Y en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIAP respectivamente es la siguiente:

Tabla 1. ***Azolla*: Composición Química (I)**

Nitrógeno	4-5%
Fósforo	0,5%
Potasio	1-2%
Calcio	0,5%
Magnesio	0,5%
Hierro	0,1%

Fuente: Montaño, 2010.
Elaborado por: El Investigador

Tabla 2. ***Azolla*: Composición Química (II)**

Humedad:	97,34%
Cenizas:	8,10%
E.E.:	2,50%
Proteína:	3,42%
Fibra:	24,95%
E.L.N.:	61,04%

Fuente: Montaño, 2010.
Elaborado por: El Investigador

Para fines de cultivo el suelo debe proveer los mencionados elementos en cantidades suficientes.

En caso de deficiencia de algunos elementos *Azolla* cambiará sus características.

Deficiencia de Fósforo: Cambia su color a café-rojizo, las raíces se tornan frágiles y se alargan.

Deficiencia de Calcio: Los lóbulos dorsales se vuelven rojizos, *Anabaena* sale al medio ambiente.

Deficiencia de Potasio: Se torna amarillenta y después de color pardo.

Deficiencia de Hierro: Disminuye la cantidad de clorofila hasta tornarse amarillenta.

3.2.3 **Fertilización**

El principal fertilizante que se necesita es fósforo, debe ser soluble en agua y se aplica a las parcelas en una proporción de 150 a 225 kg/ha, en forma de superfosfato, así como otros abonos orgánicos como Biol, Bocashi y Estiércol puro.

3.2.4 **Producción y ventajas**

Para la propagación se utiliza 10g. De *Azolla* sembrados en una piscina con un nivel de 10 cm. De profundidad, donde el cultivo se multiplica durante 12 días. Esta cantidad de *Azolla* alcanza un peso promedio relacionado de 0,14 t/día/ha.

Adicionalmente se conoce que *Azolla* duplica su peso cada 17 días en promedio y durante 3 meses que es su ciclo de vida siempre que las condiciones de medio ambientales sean favorables. (Datos particulares para la zona de estudio en el cantón Cayambe 2010).

Entre las ventajas de cultivar *Azolla* se encuentran:

- Aumento de materia orgánica.
- Ahorro del uso de fertilizantes.
- Mejora de la estructura del suelo.
- Ayuda al control de malezas acuáticas.
- Proporciona forrajes nutritivos en intervalos de 15-20 días.

3.2.5 **Usos**

El simbionte principalmente es considerado como:

- Bio-abono para los diferentes cultivos especialmente en donde genera simbiosis como en el cultivo de arroz.
- *Azolla* por su naturaleza es un hiperacumulador de N_2 (Nitrógeno atmosférico), mediante el proceso de FBN (Fijación Biológica de Nitrógeno) hasta procesarlo en NO^-_2 y NO^-_3; formas químicas de nitrógeno disponibles para los diferentes cultivos.
- *Azolla* puede ser utilizado como fuente alternativa de alimentación (forraje verde), en pequeñas especies (cuyes, conejos, gallinas); puesto que contiene valores significativos de proteína, entre otros nutrientes (Valores por establecer mediante análisis Bromatológico).
- Captadores de nitrógeno, ya que *Azolla* capta pequeñas cantidades de CO_2 desde el medioambiente, y de esta manera contribuye a la disminución del calentamiento global. (UNAD, 2010).
- *Azolla* contribuye en el control de plagas acuáticas puesto que en reservorios de agua puede llegar a cubrir toda la superficie con un espesor de 5 cm. Bloqueando así el paso de luz y con ello el desarrollo de otros cultivos acuáticos.

Imagen 2. **Helecho *Azolla*** cubriendo totalmente, formando una verdadera alfombra. (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984).

Imagen 3. **El helecho *Azolla*** visto bajo la lupa, en sus foliolos se encuentra el alga *Anabaena Azollae*, fijadora de nitrógeno (x 12). (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984).

3.2.6 **Plagas y enfermedades**

Azolla como todas las plantas es susceptible al ataque de plagas y enfermedades. Algunos organismos llegan a infestar las raíces y se pegan a las hojas, incluyendo los siguientes:

Hongos: Como la rymnacea que causa manchas grises en la superficie de las hojas.

Insectos: En especial los lepidópteros como el barrenador, barrenillo pardo, barrenillo gris, gusano hilandero y ácaros, estos se alimentan de las hojas de las plantas.

Moluscos: Como caracoles de tierra y de agua, cangrejos y pulgas de agua que se comen las raíces y las hojas de las plantas.

**Como consideración especial el cultivo de *Azolla* no es resistente al uso de herbicidas químicos. (Montaño, 2010).

3.3 Generalidades de las Cianobacterias.

Las cianobacterias son acuáticas y fotosintéticas, es decir, que viven en el agua, y puede fabricar su propio alimento. Debido a que son las bacterias, que son muy pequeñas y generalmente unicelulares, aunque a menudo crecen en colonias lo suficientemente grande como para ver. Ellos tienen la distinción de ser los fósiles más antiguos conocidos, más de 3,5 millones de años.

Muchos depósitos de petróleo Proterozoico se atribuyen a la actividad de las cianobacterias. También son importantes proveedores de fertilizantes de nitrógeno en el cultivo de arroz y frijoles. Las cianobacterias también han sido tremendamente importantes en la configuración del curso de la evolución y el cambio ecológico en toda la historia de la tierra. La atmósfera de oxígeno de los que dependemos fue generado por las cianobacterias numerosos durante el Arcaico y Proterozoico Eras. Antes de ese momento, el ambiente había una química muy diferente, no aptos para la vida tal como la conocemos hoy en día.

La gran contribución de otras de las cianobacterias es el origen de las plantas. El cloroplasto con la que las plantas producen alimento para ellos es en realidad una cianobacteria que viven dentro de las células de la planta. En algún momento de finales de los años Proterozoico, o en el Cámbrico, las cianobacterias comenzaron a establecer su residencia dentro de ciertos eucariotas las células, haciendo que los alimentos para el huésped eucariota a cambio de una casa. Este evento es conocido como endosimbiosis, y es también el origen de las mitocondrias eucariotas.

Debido a que son fotosintéticos y acuáticos, las cianobacterias son a menudo llamadas "algas azul-verdes". Este nombre resulta muy práctico para hablar acerca de los organismos en el agua que producen su propio alimento, pero no refleja una relación entre las cianobacterias y otros organismos llamados algas. Las cianobacterias son parientes de las bacterias, no los eucariotas, y sólo los cloroplastos en las algas eucariotas que las cianobacterias están relacionados. (Speer, 1995)

Anabaena azollae es un cianobacteria filamentosa que presenta células vegetativas y heterocísticas (Organela que contiene al complejo nitrogenasa) – estas células son las más grandes, poseen una pared gruesa y la capacidad de fijación de nitrógeno (Imagen 5). Esta fijación de nitrógeno se hace en ausencia de oxígeno y convierte el nitrógeno del ambiente en amoníaco.

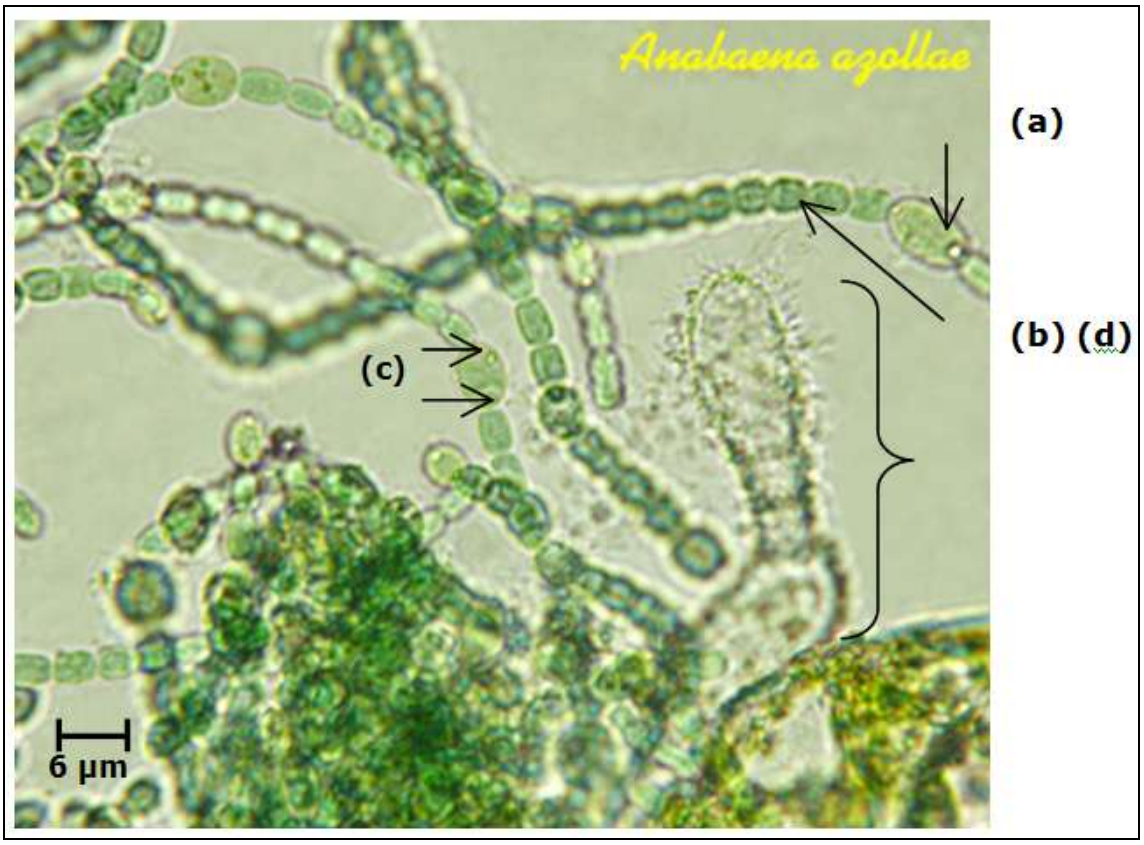


Imagen 4. ***Anabaena azollae***: Heterocistos (a); Célula vegetativa (b); Nódulos Polares (c); *Azolla filiculoides*: Trichomas (Responsables del intercambio metabólico) (d). (PEREIRA; RITA; PAZ; CARRAPIÇO, 2010)

3.4 Embriología

La multiplicación de las especies de *Azolla* se realiza por esporas, como es propio de los helechos; y también por división espontánea (brote lateral) de las plantas adultas: la rama más grande tiende a dividirse de la planta madre una vez que alcanza una dimensión suficiente, echando sus propias raíces y convirtiéndose en una nueva planta. (Las Eras, 2006).

El desarrollo del esporocarpo de *Azolla* se asocia frecuentemente a los meses de verano en las regiones templadas, este se forma por tallos cortos sobre el primer brote del lóbulo ventral de una rama lateral y se produce en pares.

Un par de esporangios pueden ser iguales o de distinto sexo, los micro esporangios (machos) se desarrollan en la parte apical de las células y globulares con relación a los megaesporangios (hembras) que son pequeñas y forma ovoide.

Los megasporocarpos y los microsporocarpos se abren en la madurez y se hunden. Después de un periodo de latencia, una megaespora germina produciendo el prótalo femenino el cual a su vez produce uno o más arquegonios.

Las vacuolas se forman en el periplasmodio y dan origen a los corpúsculos flotantes característicos.

Las másulas se forman de las vacuolas revestidas por una red de membrana citoplasmática endurecida, pueden ser descubiertas, o parcial o totalmente cubiertas con pelos sobresalientes.

El embrión produce una raíz de las células hipobasales, y un brote de un cotiledón de las células epibasales, a medida que el cotiledón y la primera o segunda hoja emergen del cuello del arquegonio, la plántula brota hacia la superficie. (Montaño, 2010).

3.5 Simbiosis, fuente de innovación evolutiva.

La historia de la simbiosis empieza desde hace millones de años atrás, probablemente incluso antes de la primera manifestación de vida que se generó en nuestro planeta (el Carrapiço et al., 2007). Pero es hasta el año 1867 con la presentación del botánico suizo Simón Schwendener, donde se expresa la primera "hipótesis dual" relacionada a la estructura de los líquenes. Aunque Alberto Bernhard Frank introdujo el término "el simbiotismo" en 1877, la palabra "simbiosis" se acreditó a Anton de Bary que, 1 año después, lo definió como "organismos diferentes viviendo juntos" (Frank, 1877; De Bary, 1878; Sapp, 1994,; El Sapp et al., 2002). Este concepto se presentó en una comunicación titulada "Ueber Symbiose" ("En la Simbiosis") durante una reunión del Congreso de Naturalistas alemanes y Médicos, a Kassel en Alemania (De Bary, 1878).

Uno de los materiales biológicos usado por este autor explicar y caracteriza el fenómeno de simbiosis en la asociación de *Azolla-Anabaena* (De Bary, 1878, 1879).

Se consideró esta asociación como un ejemplo de un caso del mutualismo aplicado al reino vegetal y basado en la definición introducida en 1875 por el zoólogo belga Pierre-Joseph (De Bary, 1878; Sapp, 1994, 2003).

La simbiosis es uno de los procesos principales responsable de la biodiversidad y evolución en Tierra, principalmente su función es de tipo morfológico y fisiológico, en los organismos. (CARRAPIÇO, 2010).

3.5.1 **Simbiosis de *Azolla-Anabaena (AA)***

Azolla es un helecho semi-acuático, constituye el ejemplo de un sistema simbiótico sinergistico. En la hoja del lóbulo dorsal, hay una cavidad del elipsoide con una cianobacteria llamada *Anabaena azollae*. Esta cavidad de la hoja se comporta como la unidad de la interfaz fisiológica y dinámica de esta asociación simbiótica dónde los flujos metabólicos y enérgicos principales ocurren.

Todas estas ideas y estudios, reflejan la importancia de este helecho y permite tener una visión más amplia y dinámica de la caracterización del sistema de simbiosis de *Azolla-Anabaena*. (CARRAPIÇO, 2010).

Anabaena azollae es la única especie de cianobacteria investigada en asociación simbiótica con *Azolla* y está presente en todas las fases del ciclo de vida del helecho.

Anabaena azollae, en reposo, coproduce esporas debajo del indusio y dentro del brote apical. Cuando las esporas germinan se tornan mucilaginosas y producen pequeños filamentos de *Azolla-Anabaena.* (Montaño, 2010).

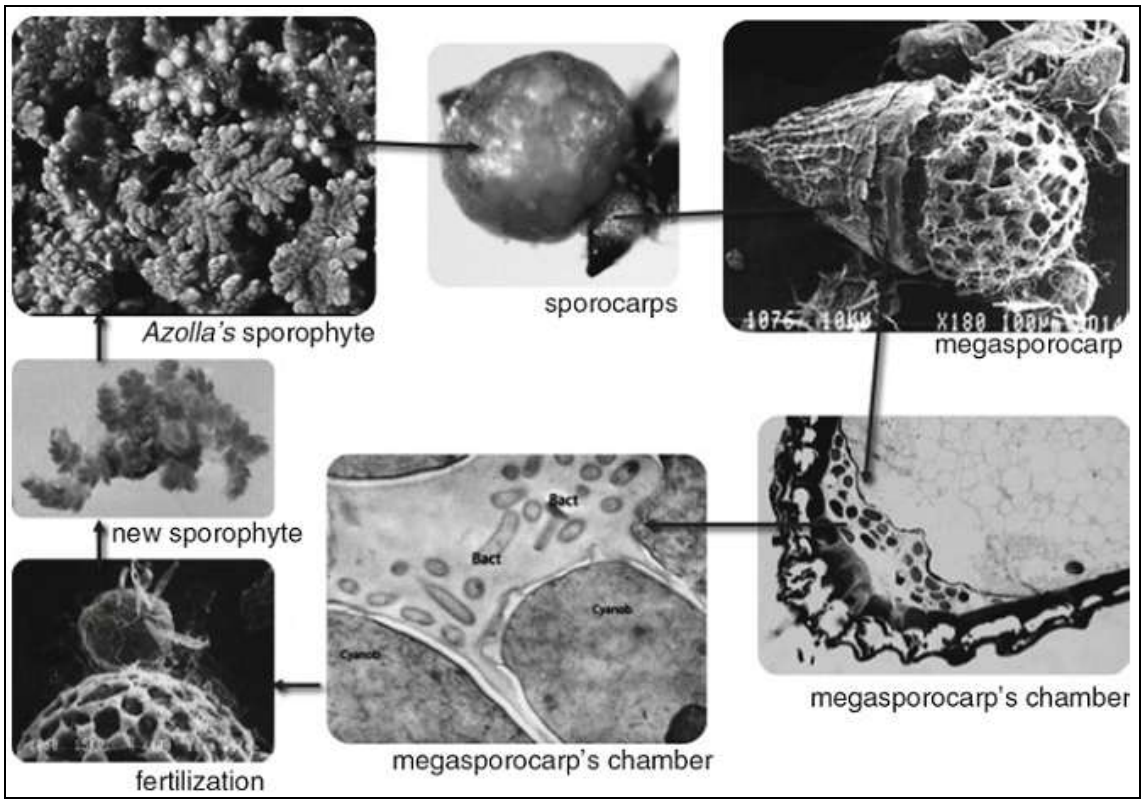


Imagen 5. Ciclo de vida de las especies de *Azolla*, donde se esquematiza la presencia de la cianobacteria (cyanob) durante todo el ciclo de vida del helecho. (CARRAPIÇO, 2010).

Los pelos epidérmicos que se encuentran dentro de la cavidad de la hoja parecen ser los órganos de intercambio metabólico entre el helecho y la cianobacteria, ya que muestran un denso citoplasma que contiene un retículo abundante y numerosas mitocondrias en la morfología de las células transferibles.

Toda esta información refleja el concepto de súper organismo, en la que cada planta y animal deben ser considerados como el simbionte donde se incluyen ambos grupos de genes en el denominado "súper organismo celular", así como la información genética de bacteria del simbionte que vive dentro del organismo (Sapp, 2003). También es importante tener en cuenta la relevancia de la aptitud y predominio simbiótico (Bouchard, 2007). La simbiosis *Azolla-Anabaena* se considera un ejemplo de simbiosis hereditaria.

La capacidad fijadora de nitrógeno del sistema, del orden de 3 kg. de nitrógeno por Ha. por día, junto con su rápida propagación, duplicando su biomasa entre tres y seis días, su rápida descomposición en el suelo, así como el hecho de no transmitir enfermedades a los cultivos, la hacen útil como biofertilizante. (Tabla 1.) Siempre que se controle su

desarrollo, ya que puede ocasionar algunos problemas ecológicos al causar la desaparición de otras plantas ya existentes. (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984). Su utilización actual dentro del cantón Cayambe como fertilizante es mínima.

Tabla 3. ***Fijación*** **de nitrógeno de asociaciones simbióticas entre algas cianofíceas y plantas.**

Planta asociada	Género de Cianoficea (alga azul-verdosa)	Cantidad de Nitrógeno fijado. Kg. /Ha. año
Hongos	Calothrix Nostoc	1-10
Hepáticas *Anthoceros*	Nostoc	1-10
Musgos *Sphagnum*	Nostoc	1-10
Helechos *Azolla*	Anabaena	10-200
Gimnospermas *Macrozamia*	Nostoc	20
Angiospermas *Gunnera*	Nostoc	10-70

Fuente: Montaño, 2010.
Elaborado por: El Investigador

3.5.2 **Fijación de nitrógeno por parte de *Anabaena azollae.***

Las especies de *Azolla* son plantas que acogen en la cavidad de sus hojas a la cianobacteria simbionte del género Anabaena (*Anabaena azollae*), bacteria fijadora de nitrógeno. Esta cianobacteria tiene, gracias a sus células especializadas llamadas heterocistes, la habilidad de tomar el N_2 del aire, donde es el gas más abundante, y reducirlo a amonio (NH^+_4), una forma que todas las células pueden aprovechar. Los autótrofos que no pueden fijar el N_2, tienen que tomar nitrato (NO^-_3), que es una sustancia muy escasa en la naturaleza, de modo que estas algas simbiontes suministra nitrógeno a la planta. (Las Eras, 2006).

Esta planta también tiene capacidad para actuar como un "hiperacumulador", es decir, que tiene capacidad para acumular y por tanto eliminar del agua metales pesados como Hg y Cr. La presencia de estos compuestos en altas cantidades, no obstante, inhibe el crecimiento de la planta. (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984).

Se hacen grandes esfuerzos para extender la capacidad de fijar nitrógeno a las gramíneas, y de proporcionar al menos una parte de nitrógeno que necesitan, *Azolla* produce grandes cantidades de biomasa y fija cerca de 55 kg N/ha/mes; esto equivale a 250 kg .de sulfato de amonio y 120 kg. De urea.

Es por eso que los procesos biológicos que fijan el nitrógeno atmosférico necesario para el crecimiento de las plantas por medio de simbiosis o de los organismos vivos, ofrecen un promisorio beneficio productivo, económico y ambiental.

En presencia de Amonio la capacidad de fijar nitrógeno del medio ambiente varía según la cepa del fijador, también puede haber una baja capacidad fijadora por el nitrógeno combinado y los nitratos que inhiben el funcionamiento del complejo enzimático de la denitrogenasa.

Algunos de los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en *Azolla* son:

Tabla 4. **Microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en *Azolla.***

Agrobacterium radiobacter
Azospirillum brasiliense
Azotobacter chroococcum
Beijerinckia sp.
Clostridium sp.
Corynebacterium jeikeium
Enterobacter cloacae

Fuente: Montaño, 2010.
Elaborado por: El Investigador

Estos organismos viven en la rizosfera del arroz alimentándose de azúcares que se encuentran en las excreciones mucilaginosas de las raíces de las gramíneas.

3.6 Identificación del material vegetal:

La identificación del material vegetal de *A. Caroliniana*, consideró las características taxonómicas y morfológicas definidas por los estudios del Ing. Mariano Montaño con el proyecto "*Converting Rice Fields into Green Fertilizer Factories (5381)"*, llevado a cabo entre el Banco Mundial y la ESPOL en el 2010; ya que el material vegetal utilizado fue traído del azolario perteneciente al proyecto y ubicado en el cantón San Borondón de la provincia del Guayas.

La identificación del material vegetal de *A. Mexicana y A. Filiculoides,* consideró las características presentes en la colección botánica del género *Azolla* que reposa en el herbario del Departamento de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en Quito (Herbario QCA), el cual posee varias muestras de *Azolla* colectas en la zona Centro y Norte del país desde la década del ´80.

A. Filiculoides se muestra como una planta algo alongada y de ramas en forma de pino, con presencia de papila sobre todas las partes del cuerpo de la planta especialmente el tallo principal. Su órgano reproductivo masculino (microesporocarpo), posee de (40 a 65) esporangios, el número de másulas por esporangio es de (3 a 8), con presencia de menos de tres sectas sobre gloquidio en las másulas y textura "punteada" (parecida a una bola de golf) del órgano reproductivo femenino (megaesporodermo). (ESPINOZA, Y. y GUTIERREZ, R., 2003)

Azolla filiculoides muestra una masa de esporas (másula) con proyecciones de púas única llamada gloquidios. *A. Mexicana* muestra una masa de esporas con proyecciones de gloquidios septadas con varias particiones distintas. (ARMSTRONG, 1998).

a) Gloquidios sobre el órgano masculino

b) Órgano femenino

Imagen 6. ***Azolla*:** a) Órgano reproductivo masculino mostrando; los gloquidios con menos de tres septas sobre la másula del esporangio. b) Órgano reproductor femenino. Textura punteada del megaesporodermo. (ESPINOZA; GUTIERREZ, 2003).

3.6.1 **Taxonomía de *Azolla.***

Azolla pertenece al género *Azolla salviniáceas*, una familia de helechos criptógamos flotantes. (Montaño, 2010).

Este género se divide en seis secciones y especies vivientes principalmente en base a los órganos reproductores (sacos flotantes de megaesporas y gloquideos de la másulas).

La identificación de las especies de *Azolla* es generalmente difícil debido a la usual ausencia de esporocarpos, pero después de estudios realizados a *Anabaena azollae*, se la puede clasificar en las siguientes categorías.

Tabla 5. ***Azolla*: Taxonomía**

Helecho:	*Azolla*
División:	Pteridophyta
Clase:	Filicopsida
Orden:	Salviniales
Familia:	*Azollaceae*
Género:	*Azolla*
Especie:	*Caroliniana, Filiculoides, Mexicana.*
N.C.	*Azolla Caroliniana, A. Filiculoides, A. Mexicana*

Fuente: Montaño, 2010.
Elaborado por: El Investigador

Tabla 6. ***Anabaena azollae*: Taxonomía**

Cianobacteria:	*Anabaena azollae*
División:	Cyanophitas
Clase:	Cyanophyceae
Subclase:	Hormogonophycideae
Orden:	Nostocales
Familia:	*Nostocaceae*
Género:	Anabaena
Especie:	*Azolla*
N.C.	*Anabaena azollae*

Fuente: Montaño, 2010.
Elaborado por: El Investigador

3.7 Condiciones Medioambientales

Para que *Azolla* se desarrolle y mantenga el sistema simbiótico en buenas condiciones, es necesario que se cumplan los siguientes factores:

Temperatura: El cultivo no presenta problemas de temperatura pues soporta un rango bastante amplio como para no ser un factor determinante. (Las Eras, 2006).

Generalmente su temperatura a nivel del trópico oscilar entre 20°C y 28 °C, pero a nivel de la sierra hay especies adaptadas a temperaturas entre 7°C y 23°C. Que es la temperatura que presenta Cayambe. (INAMHI, 2011).

** *Azolla* no resiste temperaturas inferiores a 0°C. O superiores a 35°C. (Las Eras, 2006).

pH: Los suelos con un pH entre 6 y 7 son los más adecuados.

Agua: El agua es un factor importante debido a que el helecho es sensible a la desecación, es recomendable mantener una cierta profundidad de agua (10 cm) y se requiere hasta 25 mg de fósforo aproximadamente (superfosfato triple) por kg. De suelo húmedo. (Montaño, 2010).

Viento: El viento fuerte puede matar a *Azolla*, Para la provincia de Pichincha se registró una velocidad de viento entre 5 km/h y 40 km/h. (Wunderground, 2011)

Iluminación: No presenta problemas con respecto a la luz, adaptándose a condiciones de estanque a pleno sol; o bien en la sombra. (Las Eras, 2006).

En condiciones sombreadas *Azolla* mantiene su color verde natural, mientras que la luz directa del sol llega a tornar sus hojas de color rojizo. Para la zona de Cayambe se registró una luminosidad de 5,5 Kw/m^2 (INAMHI, 2011).

3.8 Nitrógeno como fertilizante.

El nitrógeno es absorbido del suelo por la planta para formar proteínas y enzimas; aumenta la cantidad de macollos, el tamaño de la hoja, el diámetro de las raíces y la relación parte aérea-raíz. Es decir, el nitrógeno aumenta tanto la relación de materia seca como el contenido de proteína. El nitrógeno en las plantas representa hasta el 3% del peso seco.

El nitrógeno es parte integral de la molécula de clorofila, un adecuado suministro de nitrógeno se reflejará en un crecimiento vigoroso de la planta y un color verde del follaje. Cuando hay deficiencia de nitrógeno, la planta paraliza su crecimiento, se pone clorótica, de aspecto leñoso y fibroso.

Las plantas no leguminosas normalmente absorben nitrógeno en las formas de NO^-_3 y NH_4^+. Aunque la mayor parte es en NO^-_3, para luego transformarse en las hojas a NH^+_3, luego en aminoácidos y por último en proteínas; por ello se admite que la fertilización aumenta el contenido de proteína y materia seca. (León, 2003).

Al ser el Nitrógeno uno de los elementos que más requieren los cultivos el cual es aplicado en el suelo en forma de urea, nitratos y sulfatos. Aproximadamente se recomiendan, 120 Kg./ ha de nitrógeno en forma de urea o sulfato de amonio, para el cultivo del arroz, y se ha estimado que la eficiencia del uso de los fertilizantes nitrogenados en este cultivo es de aproximadamente del 25 a 35% (Rico y De Datta 1982, Carrillo 1989), lo que indica que el agricultor pierde el 70% del fertilizante aplicado. El nitrógeno perdido no va a la atmósfera sino a las aguas de drenaje o ríos y reservorios de agua, lo que constituye una fuente de contaminación de los suelos y aguas, pudiendo causar un daño ecológico severo. La baja eficiencia del uso de los fertilizantes nitrogenados en el cultivo del arroz ha sido atribuida a las múltiples vías de pérdidas del nitrógeno en las condiciones de inundación donde se cultiva

(Ponnmaperuma, 1972, Rivillo, 1986). Una de las alternativas para disminuir la dependencia de los fertilizantes nitrogenados, puede ser la utilización de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, mediante el uso de *Azolla-Anabaena*. (Handi, 1985). (NAVAS, 1998).

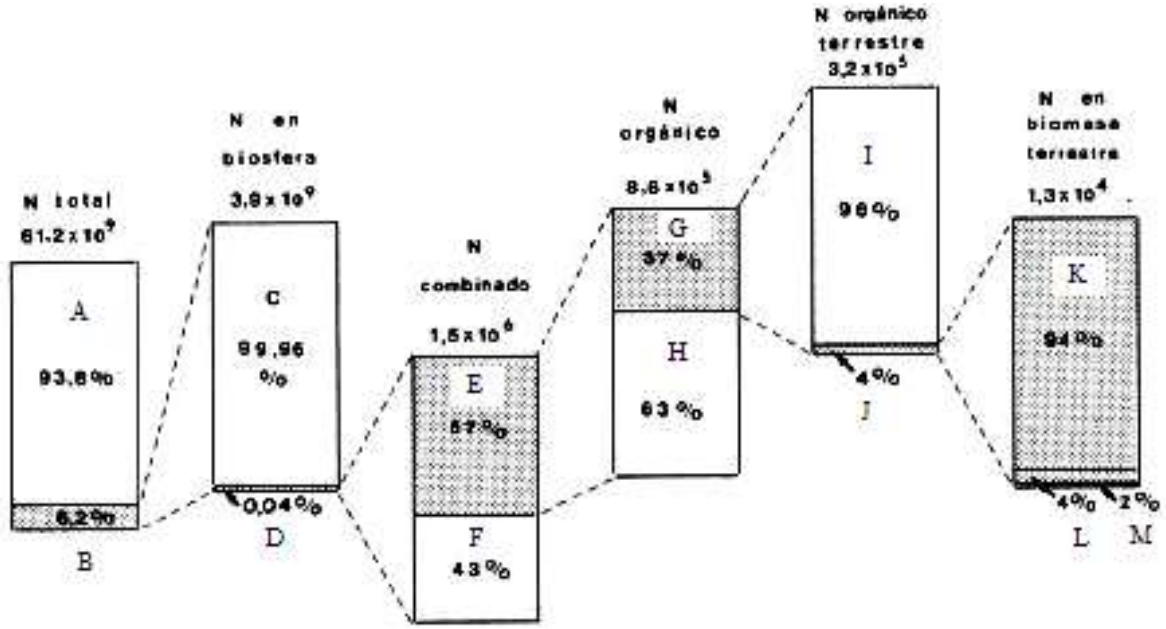


Imagen 7. **Distribución de nitrógeno (N) en la Tierra.**
Expresada en millones de Tm. A: corteza; B: biosfera; C: atmosférico; D: combinado; E: orgánico; F: inorgánico; G: orgánico terrestre; H: o. acuático; I: en materia orgánica muerta; J: en biomasa; K: en plantas; L: en microbios; M: en animales. (Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 1984).

3.8.1 **Ciclo del Nitrógeno (Transformaciones que intervienen)**

Se trata de un conjunto de transformaciones (fig.2) donde ocurren varias etapas, y entre ellas destacaremos:

La reserva inagotable de nitrógeno de la atmósfera regula el aporte de ese elemento al ciclo, a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), especialmente en aquellos sistemas suelo-planta y posteriormente animal-hombre, desde donde se procesa este elemento.

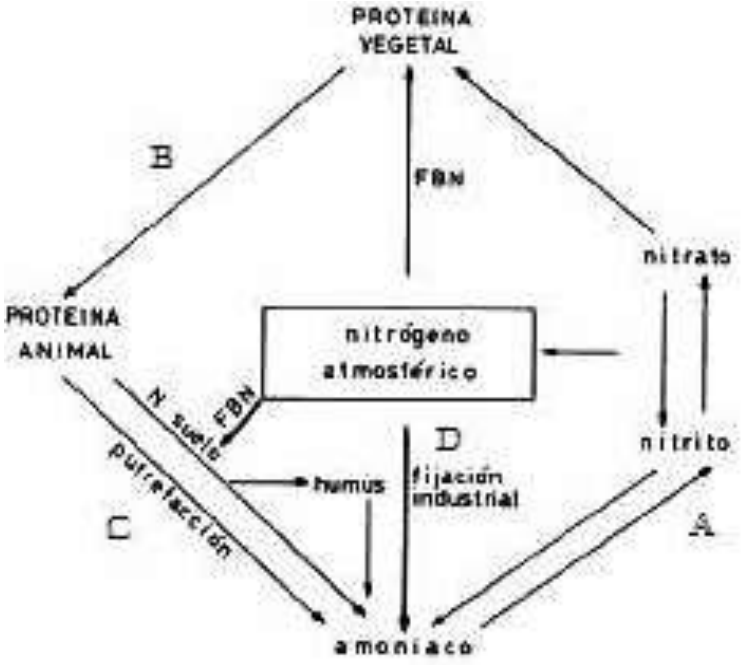


Imagen 8. **Ciclo simplificado del nitrógeno en la Naturaleza.** (Rodríguez, C., Sevillano, F. Y Subramaniam P., 1984).

a) Formación de nitrógeno inorgánico, como amoníaco, nitrito y nitrato, a partir de nitrógeno orgánico procedente de la desintegración de los organismos y de sus excreciones, en un proceso de mineralización.

b) El nitrógeno inorgánico puede ser absorbido por plantas y microorganismos, pasar de nuevo a formar parte de la materia viva, y circular a lo largo de las cadenas de alimentación.

c) El nitrógeno inorgánico puede ser transformado en nitrógeno molecular y sus óxidos, que escapan a la atmósfera en un proceso de desnitrificación.

d) El nitrógeno molecular atmosférico pasa a forma combinada en un proceso de fijación.

Conviene destacar algunos puntos de interés acerca del ciclo del nitrógeno:

- ✓ Muchas de las transformaciones son realizadas por unos pocos organismos.
- ✓ Es fácilmente afectado por el hombre a través de la utilización creciente de fertilizantes, y de la emisión de óxidos de nitrógeno a la atmósfera como consecuencia de las combustiones industriales. (Rodríguez, C., Sevillano, F. Y Subramaniam P., 1984).

3.8.2 **Bacterias que intervienen en el ciclo del Nitrógeno.**

a) **Bacterias fijadoras de nitrógeno:** bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de tomarlo del aire en forma de gas (N_2) y combinarlo con el hidrógeno para producir amoniaco (NH^+_3).

b) **Bacterias desintegradoras:** cuando los organismos mueren se presenta el proceso de descomposición en el que participan bacterias desintegradoras, que transforman el nitrógeno, constituyente de las proteínas, en compuestos como el amoniaco (NH^+_3). A partir de esta sustancia se forman nitritos y nitratos por la acción de las bacterias correspondientes.

c) **Bacterias nitrificantes:** Otras bacterias, llamadas nitrificantes, transforman el amoniaco en nitritos y nitratos. Las bacterias fijadoras de nitrógeno viven libres en el suelo o asociadas a las raíces de algunas plantas como las leguminosas (alverja, fréjol, lenteja, etc.), en las que forman nódulos.

   Los nitratos producidos por las bacterias nitrificantes son utilizados por las plantas para sintetizar proteínas. Cuando el consumidor primario ingiere una planta, recibe el nitrógeno que, a la vez, utiliza en la síntesis de proteínas. Así, el nitrógeno pasa a los siguientes eslabones de la cadena.

d) **Bacterias desnitrificantes:** El nitrógeno del suelo en forma de nitrato puede ser reintegrado a la atmósfera por la acción de otro tipo de bacterias llamadas desnitrificantes. Además de la acción de las bacterias nitrificantes, la formación de nitratos también ocurre por el efecto eléctrico de los relámpagos. Durante este fenómeno se transforma el nitrógeno atmosférico en ácido nítrico, que se disuelve con la lluvia y se precipita al suelo donde puede ser utilizado. En el caso de los agros ecosistemas o campos de cultivo, el nitrógeno que requieren las plantas se adiciona en forma de fertilizantes comerciales ricos en compuestos nitrogenados. (Montaño, 2010).

3.8.3 **Nitrificación (Mineralización).**

La nitrificación tiene lugar con rapidez en la mayoría de los suelos, constituyendo el nitrato la fuente de nitrógeno más importante para la mayoría de las plantas, donde unas enzimas conocidas como nitrato-reductasas, lo convierten en amonio, que es utilizado en la síntesis de aminoácidos y proteínas. Hay que señalar que, a diferencia del amonio, el nitrato no es retenido fácilmente por el suelo, sino que es transportado por el frente acuoso en un proceso de lixiviación, de modo que si la pluviosidad es alta y el suelo es muy permeable, puede ser arrastrado a profundidades inaccesibles para las raíces. Este lavado de nitratos es un importante factor de pérdida de nitrógeno que puede ser del 50 por ciento.

El proceso opuesto a la mineralización se conoce como inmovilización. En ella, los microbios heterótrofos convierten, por amonificación, el nitrógeno orgánico, nitrógeno amoniacal, parte del cual es utilizado para su crecimiento, inmovilizándolo o haciéndolo no disponible para la alimentación de las plantas.

- ✓ En resumen, la cantidad de nitrógeno del suelo en forma asimilable por las plantas, y en ausencia de aportes nitrogenados externos, es función de la cantidad de nitrógeno orgánico de reserva en el mismo, y particularmente de los factores que afectan a su mineralización e inmovilización. (Rodríguez, C., Sevillano, F. Y Subramaniam P., 1984).

3.9 Constante de Velocidad de Crecimiento Vegetal.

La velocidad de crecimiento de *Azolla* obedece a la expresión matemática típica de crecimiento en la que, se relacionan la Masa que genera el cultivo y el tiempo en que esta se generó. A dicho tiempo o velocidad de crecimiento le pertenece una constante (k) la cual es proporcional a la masa para cada momento en que esta se localice; es decir:

$$\mathbf{d_m/d_t = km}$$

Donde: d_m= delta de la masa
d_t= delta del tiempo
k= constante de crecimiento vegetal
m= Masa proporcional a la constante de crecimiento vegetal

Ordenando la expresión:

$$\mathbf{d_m/m = kd_t}$$

Integrando la expresión:

$$\ln (m_f/m_i) = kt$$

$$\mathbf{[\ln(m_f/m_i)]/t = k}$$

Donde: ln= logaritmo natural de la expresión
m_f= Masa final
m_i= Masa inicial
t= tiempo

**k representa la constante de crecimiento de *Azolla* en la bandeja plástica de prueba en la comunidad "Santa Rosa de la Compañía".

De la misma fórmula general se puede calcular el tiempo de duplicación de la masa.

$$\mathbf{\frac{\ln (2m_i/m_i)}{t_2} = k}$$

Donde: ln= logaritmo natural de la expresión
m_i= Masa inicial
t_2= tiempo de duplicación
k= constante de crecimiento vegetal

Simplificando y ordenando la expresión:

$t_2 = \ln 2/k$

La productividad se establece entre el aumento de masa (Δ_m), el tiempo (t) y el área media representativa (A_m). Los valores de estas características son:
$\Delta_m = m_f - m_i$

$A_m = (A_f + A_i)/2$

$P = \Delta_m/t/A_m$; t/día/ha; kg/mes/m^2; …

Donde:
- Δ_m= Aumento de la Masa
- m_f= Masa final
- m_i= Masa inicial
- A_m= Área media representativa
- A_f= Área final
- A_i= Área inicial
- P= Productividad (t/día/ha; kg/mes/m^2;…)

(Macías N., Maruri J., Sánchez F., Montaño M., 2010).

3.10 Ley de Shatellier

Nos indica que: "Todo sistema busca entrar en equilibrio, es decir si se percibe el exceso de un elemento en específico, el sistema hará lo posible por reducir o suspender la producción de dicho elemento hasta entrar en equilibrio."

Ejemplo:

- Si al ecosistema donde se cultive el simbionte *Azolla-Anabaena*, se le aplicará artificialmente fuentes de nitrógeno, entonces *Azolla*, dejará de fijar nitrógeno a dicho ecosistema. Pues busca la generación de equilibrio en el medio.

- Si a un cultivo de arroz (*Oryza sativa*) se le aplicare UREA, entonces no permitiría el desarrollo de *Azolla*, pues este cultivo ya poseería una fuente de nitrógeno en su ecosistema.

3.11 Física cuántica en relación al tipo de nitrógeno disponible

Existen 3 métodos de producir nitrógeno disponible a partir de N_2 atmosférico:

a) La fijación espontánea es un proceso natural en que descargas eléctricas de tormentas, radiación ultravioleta, rayos cósmicos, meteoritos, combustibles industriales e incendios, entre otras causas, proporcionan momentáneamente la energía requerida para originar óxidos de nitrógeno e incluso amoníaco, a partir de nitrógeno molecular

atmosférico, que eventualmente son arrastrados por el agua de lluvia al suelo. (Rodríguez, C., Sevillano, F. Y Subramaniam P., 1984).

b) La fijación industrial química es la producción de amoníaco y fertilizantes nitrogenados por la industria a partir del nitrógeno del aire (Rodríguez, C., Sevillano, F. Y Subramaniam P., 1984), utiliza la técnica Bosh-Haber. En donde nitrógeno atmosférico es encapsulado a 250 atmósferas de presión y 800ºC de temperatura para finalmente originar compuestos como la UREA sintética con una estructura química "forzada" y cuya aplicación guardará secuelas del método por el cual fue creado.

c) La fijación biológica es la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, realizada por microbios libres o en asociación con plantas superiores, microbios que reciben por ello el nombre de diazótrofos (azoe: nitrógeno; trofos: alimentación). (Rodríguez, C., Sevillano, F. Y Subramaniam P., 1984).

También conocida como fijación biológica de nitrógeno (FBN), conversión realizada como por ejemplo en la simbiosis existente entre *Azolla* y *Anabaena* a*zollae*, donde *Anabaena* por su naturaleza de ser una cianobacteria, fija nitrógeno atmosférico en el helecho *Azolla*, dicho nitrógeno se convierte en disponible hacia la planta de forma natural, sin secuelas en su estructura química.

4. CARACTERÍSTICAS DEL SITIO EXPERIMENTAL

4.1 Ubicación Político Territorial

País:	Ecuador
Provincia:	Pichincha
Cantón:	Cayambe
Parroquia:	Ayora
Comunidad:	Santa Rosa de la Compañía
Lugar:	Propiedad María José

4.2 Ubicación Geográfica

Altitud:	2900 m.
Latitud:	0.10643
Longitud:	-78.138885

4.3 Condiciones Medioambientales (nov. 2010 – feb. 2011)

- Temperatura máxima: 14 ºC
- Temperatura mínima: 5ºC+-
- Horas luz: 4h/día
- Humedad relativa: 65%+-

(Dirección Gestión Meteorológica INIAP, 2011, WUNDERGROUND, 2010)

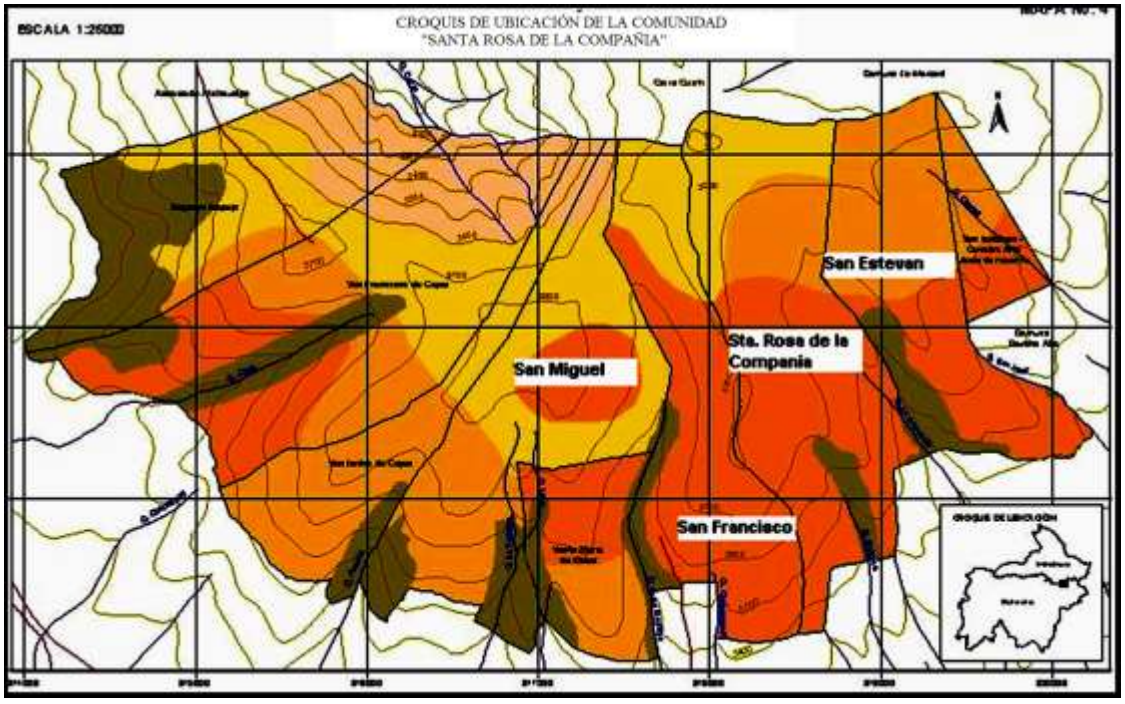


Imagen 9. **Mapa de la Comunidad: Santa Rosa de la Compañía, Sector "Las 4 Esquinas"** (Plan de manejo de los Páramos de la UNOPAC, 2008.)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material Biológico:

Material vegetal como cultivo: El material biológico de *Azolla* corresponde a las especies: *Caroliniana (*adaptada desde el Guayas*), Filiculoides* (nativa de la zona) y *Mexicana* (nativa de la zona). Provienen de los sectores: Cayambe-Santa Rosa de la Compañía (zona rural 2900 msnm), Cayambe-Paquiestancia (zona rural 3500 msnm), Cayambe-Santa Clara (zona periférica 2500 msnm), respectivamente.

- *Azolla caroliniana* 10, 15, 20 g
- *Azolla filiculoides* 10, 15, 20 g
- *Azolla mexicana* 10, 15, 20 g
- Muestra vegetal unificada de las 3 especies de *Azolla*. 1 kg. Para análisis bromatológico.

Sustrato acuoso como medio de cultivo: El sustrato acuoso lo componen principalmente muestras de agua proveniente de 3 reservorios representativos de la zona de Cayambe ubicados en Paquiestancia, Cayambe y Santa Rosa de la Compañía. De donde se ocuparan 50 litros de agua para el llenado de las bandejas y 200 litros para hacer recircular en el sistema durante el periodo de cultivo de *Azolla*.

- Agua superficial, 2 litros/bandeja.

5.1.2 Material de laboratorio

Vidrio

- Vasos de precipitado de 300 ml
- Matraz de Erlenmeyer aforado de 50 ml
- Pipeta volumétrica de 1 ml y 5 ml.
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Cubetas de cuarzo (para uso en el espectrofotómetro Nova 60, Marca Merck)

Papel

- Papel filtro

Metal

- Pizas
- Mechero Bunsen

Plástico

- Guantes de nitrilo
- Perilla de succión
- Gotero
- Bandejas plásticas de marca genérica con medida 15cm. ancho x 20cm. largo x 5cm. de profundidad, las cuales conformarán una Unidad Experimental.

5.1.3 **Reactivos**

- Test nitritos Merckoquant
- Test de Nitratos Merckoquant

5.1.4 **Equipos de laboratorio**

- Fotómetro modelo Nova 60, marca Merck
- Balanza electrónica
- Microscopio

5.1.5 **Material de campo**

- Agua superficial.
- Marcador
- Bandejas plásticas.
- Etiquetas
- Cámara fotográfica

5.1.6 **Material de oficina**

- Computadora
- Libreta de apuntes
- Papelería

5.2 Métodos

5.2.1 **Diseño Experimental**

Para el análisis estadístico de las aguas provenientes de ecosistemas acuáticos del cantón Cayambe, se utilizará un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) con arreglo factorial 3x3+1.

Estableciendo: 3 especies de *Azolla* por 3 dosis de cultivo más 1 factorial consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

Tabla 7. ADEVA para cantidad de Nitrito NO^-_2 y de Nitrato NO^-_3.

Medido en base a la fijación por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/L y mg. NO^-_3/l.) En la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación de cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

FV	GL
Total	29,000
Tratamiento	9,000
Especies de Helecho acuático Azolla	2,000
Dosis de aplicación en el cultivo	2,000
Especies x Dosis	4,000
Agua con el helecho acuático Azolla **VS.** Agua sin el helecho acuático Azolla	1,000
Repeticiones	2,000
Error Experimental	20,000

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

5.2.2 **Tratamientos**

Tabla 8. Codificación de los Tratamientos para Nitritos NO^-_2 y Nitratos NO^-_3.

Medidos en miligramos fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/l. Y mg. NO^-_3/l.) En la evaluación de 3 especies del helecho acuático *Azolla* y 3 Dosis de aplicación de cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

Número	Tratamiento	Codificación	Observación
1	I	z1b1	Azolla Cayambe en proporción de 10 g.
2	I	z1b2	Azolla Cayambe en proporción de 15 g.
3	I	z1b3	Azolla Cayambe en proporción de 20 g.
4	I	z2b1	Azolla Guayas en proporción de 10 g.
5	I	z2b2	Azolla Guayas en proporción de 15 g.
6	I	z2b3	Azolla Guayas en proporción de 20 g.
7	I	z3b1	Azolla Paquiestancia en proporción de 10 g.
8	I	z3b2	Azolla Paquiestancia en proporción de 15 g.
9	I	z3b3	Azolla Paquiestancia en proporción de 20 g.
10	I	z0b0	Testigo: agua sin el helecho acuático Azolla
11	II	z1b1	Azolla Cayambe en proporción de 10 g.
12	II	z1b2	Azolla Cayambe en proporción de 15 g.
13	II	z1b3	Azolla Cayambe en proporción de 20 g.
14	II	z2b1	Azolla Guayas en proporción de 10 g.
15	II	z2b2	Azolla Guayas en proporción de 15 g.
16	II	z2b3	Azolla Guayas en proporción de 20 g.
17	II	z3b1	Azolla Paquiestancia en proporción de 10 g.
18	II	z3b2	Azolla Paquiestancia en proporción de 15 g.
19	II	z3b3	Azolla Paquiestancia en proporción de 20 g.
20	II	z0b0	Testigo: agua sin el helecho acuático Azolla
21	III	z1b1	Azolla Cayambe en proporción de 10 g.
22	III	z1b2	Azolla Cayambe en proporción de 15 g.
23	III	z1b3	Azolla Cayambe en proporción de 20 g.
24	III	z2b1	Azolla Guayas en proporción de 10 g.
25	III	z2b2	Azolla Guayas en proporción de 15 g.
26	III	z2b3	Azolla Guayas en proporción de 20 g.
27	III	z3b1	Azolla Paquiestancia en proporción de 10 g.
28	III	z3b2	Azolla Paquiestancia en proporción de 15 g.
29	III	z3b3	Azolla Paquiestancia en proporción de 20 g.
30	III	z0b0	Testigo: agua sin el helecho acuático Azolla

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

5.3 Característica de la Unidad Experimental.

**Bandejas plástica de marca genérica con medida 15cm. ancho x 20cm. largo x 5cm. de profundidad, conteniendo 2 litros de agua como medio de cultivo, la cual conformó la Unidad Experimental.

Número de Unidades Experimentales:	30
Área total del ensayo:	12 m^2
Distancia entre unidades experimentales:	0.15m x 0.20m
Cantidad de *Azolla*:	0 g, 10 g, 15g, 20 g.

5.4 Variables

5.4.1 **Biomasa de *Azolla*.**

La velocidad de crecimiento de *Azolla* obedece a la expresión matemática típica de crecimiento en la que, se relacionan la masa que genera el cultivo y el tiempo en que esta se desarrolló. A dicho tiempo o velocidad de crecimiento le pertenece una constante (k) la cual es proporcional a la masa para cada momento en que esta se localice. (Ver ítem 3.6 Constante de velocidad de crecimiento vegetal).

5.4.2 **Nitrógeno fijo en el agua:**

Para nitrógeno fijo en agua se cuantificó dos especies químicas Nitritos NO^-_2 y Nitratos NO^-_3, medidos en miligramos fijados por litro de agua de cultivo.

Miligramos de Nitritos fijados por litro de agua de cultivo (mg NO^-_2/L).

Para dicho análisis se utilizó el protocolo usado por MERCK (Ver tema 6.1.9, ítem a, Análisis de laboratorio, Test de Nitritos NO^-_2 para agua.).

Miligramos de Nitratos fijados por litro de agua de cultivo (mg NO^-_3/L).

Para dicho análisis se utilizó el protocolo dado por MERCK (Ver tema 6.1.9, ítem b, Análisis de laboratorio, Test de Nitratos NO^-_3 para agua.).

5.4.3 **Nitrógeno fijo en la planta:**

Nitrógeno total o Proteína en la planta (%).

Para dicho análisis se procedió a realizar un ensayo de tipo proximal como el utilizado en muestras alimenticias de consumo humano, para lo cual se utiliza el protocolo dado por el INIAP. (Ver tema 6.1.9, ítem c, Análisis de laboratorio, Nitrógeno total o Proteína en la planta (%).

5.5 Análisis funcional

Se registro el promedio (x) y el coeficiente de variación (CV) se expreso en porcentaje (%). Se realizó a prueba de Tukey al 5% para repeticiones e interacciones.

5.6 Croquis del ensayo

Tabla 9. Croquis del ensayo e identificación para tratamientos y repeticiones. La ubicación y selección de los tratamientos fue de forma aleatoria para Nitrito NO^-_2 y Nitrato NO^-_3, fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/l. y mg. NO^-_3/l.) En la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación de cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

CUADRO DE CROQUIS DEL ENSAYO					
I		**II**		**III**	
T2	z2b1	T6	z1b3	T8	z2b3
T3	z3b1	T7	z1b2	T0	z0b0
T5	z2b2	T5	z2b2	T6	z1b3
T9	z3b3	T0	z0b0	T4	z3b2
T1	z1b1	T1	z1b1	T7	z1b2
T8	z2b3	T8	z2b3	T1	z1b1
T6	z1b3	T3	z3b1	T2	z2b1
T7	z1b2	T9	z3b3	T5	z2b2
T4	z3b2	T4	z3b2	T9	z3b3
T0	z0b0	T2	z2b1	T3	z3b1

**z0b0 corresponde al testigo agua sin el helecho acuático *Azolla.*
**I, II y III corresponden a las Repeticiones 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 10. Codificación para tratamientos y dosis utilizadas

	Especies	
	Denominación	**Nombre Científico**
z1	Azolla Cayambe	*Azolla mexicana*
z2	Azolla Guayas	*Azolla caroliniana*
z3	Azolla Paquistancia	*Azolla filiculoides*

Dosis	**cantidad**
b1	Sin Azolla
b1	con 10 g.
b2	con 15 g.
b3	con 20 g.

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

6. MANEJO ESPECÍFICO DEL ENSAYO

6.1 Preparación del ensayo

6.1.1 **Soportería para las bandejas.**

Esta soportería usó como materia prima: tiras cuadradas de 2 cm. De espesor (para bandejas) y postes de madera de 10 y 20 cm de diámetro (para cubierta). El diseño de la estructura fue del tipo gradilla con 3 niveles. Cada uno se situó a diferentes alturas, las cuales representaron las 3 repeticiones que tiene el ensayo.

En cada nivel se estableció 10 subdivisiones consecutivas cuya función fue soportar a las 10 bandejas plásticas que contuvieron a las 3 especies del helecho *Azolla* junto con el agua de cultivo.

6.1.2 **Establecimiento de la cubierta de protección.**

Se usó como materia prima tiras de madera de 2 cm. De espesor y postes de 10 cm. De diámetro. La estructura fue diseñada a dos aguas y a una altura de 2 m.

6.1.3 **Material biológico.**

Se recolectó en 3 diferentes sitios, en los cuales; el cultivo del helecho *Azolla* ya se encontraba establecido y adaptado a sus condiciones medioambientales. Se utilizaron materiales biológicos de *Azolla* correspondiente a las especies:

- (z1). *Azolla mexicana* denominada Azolla Cayambe, es nativa de la parroquia de Santa Clara y pertenece al cantón Cayambe (2500 msnm).

- (z2). *Azolla caroliniana,* denominada Azolla Guayas, nativa del cantón San Borondón y posteriormente adaptada en la comunidad Santa Rosa de la Compañía perteneciente al cantón Cayambe (2900 msnm).

- (z3). *Azolla filiculoides* denominada Azolla Paquiestancia, es nativa de la comunidad que lleva su nombre y pertenece al cantón de Cayambe (3500 msnm).

Posteriormente se reprodujo cada una de las tres especies vegetales (Bandeja Madre), en la comunidad Santa Rosa de la Compañía como sitio de la investigación, en función de poseer disponibilidad de helechos.

Se instaló 3 diferentes dosis de cultivo de *Azolla*: 10g. 15g. y 20 g. todas con igual cantidad de agua (2 litros) y a una profundidad de 10 cm. Adicionalmente se incorporó una cuarta dosis de 0g. Como testigo.

6.1.4 **Sustrato Acuoso.**

El sustrato acuoso lo compuso principalmente muestras de agua filtrada proveniente de 3 reservorios para agua de riego representativos de la zona de Cayambe ubicados en Paquiestancia (a 1 km. Desde el centro poblado), Cayambe (a 3 km. Desde la zona urbana) y Santa Rosa de la Compañía (sitio de investigación).

Provenientes de estos 3 sectores se unificaron 50 litros de agua para el llenado de las bandejas y 200 litros de agua para recircular en el sistema, estos últimos se ubicaron en un tanque recuperador que cumple la función de acopiar el agua que recircula durante todo el periodo de cultivo de *Azolla.* Esto para cubrir las pérdidas por evapotranspiración.

6.1.5 **Sistema de Recirculación de Agua.**

Las bandejas se soportaron dentro de un sistema de recirculación continua de agua, que se generó principalmente por gravedad al inicio y posteriormente en el reflujo por una bomba de agua tipo pecera. Se cubrió así cada una de las 3 repeticiones del estudio hasta que el agua llegó a un reservorio usado como acopio, el cuál poseía un volumen de 200 litros; que se destinó principalmente a solventar la evapotranspiración que sucedió durante el tiempo de crecimiento de *Azolla*.

6.1.6 **Establecimiento de la Unidad Experimental**

Para establecer las 27 diferentes unidades experimentales se procedió a incorporar en cada una de las bandejas plásticas una de las tres diferentes dosis de cultivo 10g. 15g. y 20g. Además se incorporó 3 unidades experimentales más, usadas como testigo, para completar un total de 30. Todas se ubicaron respectivamente y previo escogimiento al azar. Para ello se utilizó la balanza analítica con precisión de 0,01 g.

6.1.7 **Crecimiento de *Azolla***

La velocidad de crecimiento de *Azolla* obedeció a la expresión matemática típica de crecimiento en la que, se relacionó la masa que formó el cultivo y el tiempo en que esta se generó. A dicho tiempo o velocidad de crecimiento le perteneció una constante (k) la cual fue proporcional a la masa para cada momento en que esta se localizó. (Ver ítem 3.4 Constante de velocidad de crecimiento vegetal).

Con motivo de medir únicamente el factor de crecimiento del cultivo de *Azolla*, para la toma de muestras vegetales en las 30 unidades experimentales Se procedió de la siguiente manera:

1. Se registró la fecha en que se tomó la muestra.
2. Se interrumpió el flujo de agua en el circuito de cultivo.
3. Se procedería a pesar cada una de las bandejas que constituyen 1 unidad experimental.
4. Inicialmente se pesará la bandeja plástica con agua en su contenido (2 litros)
5. A continuación se pesará la bandeja plástica que contiene los 2 litros de agua más la biomasa de *Azolla.*
6. Posteriormente se realizará la diferencia y se obtendrá la biomasa en gramos de *Azolla*.

7. Esta lectura se la realizará por dos ocasiones cada 6 días, tiempo en el que el cultivo de *Azolla* cubrirá la totalidad de la bandeja plástica.
8. Se registrarán los datos obtenidos en el formato #001 (Ver anexos)
9. Finalmente se activará la recirculación del sistema en función de continuar con el cultivo de *Azolla*.

m_1= (bandeja plástica + agua) (g.)
m_2= (bandeja plástica + agua + *Azolla*) (g.)
m_2-m_1= (biomasa de *Azolla*) (g.)

6.1.8 **Extracción de Muestra Acuosa para análisis de laboratorio.**

Para la toma de muestras acuosa en las 30 U.E. de que consta el ensayo se deberán hacer las siguientes consideraciones previas al análisis:

- Se determinará como el tiempo adecuado para realizar el análisis de Nitritos y Nitratos el momento en que la primera unidad experimental cubre superficialmente al 100% la bandeja plástica que la contiene. (Recordando que este procedimiento se lo realizará únicamente con motivo de medir el factor de crecimiento del cultivo de *Azolla*.
- Se interrumpirá el flujo de agua en el circuito de cultivo. Buscamos estandarizar la cantidad (gramos) de *Azolla* que contendrá cada una de las bandejas plásticas (22 gramos en promedio), para el siguiente análisis.

Posteriormente se procederá de la siguiente manera:

1. Luego de suspender el flujo de agua en el circuito por un tiempo aproximado de 24 horas.
2. Se deberá preparar 30 frascos plásticos rotulados y estériles para que contengan las muestras acuosas.(agua de cultivo)
3. Se registrará la fecha en que se tomen las muestras.
4. Después de transcurrido este tiempo se procederá a tomar aproximadamente 50 milímetros de cada una de las bandejas que constituyen 1 unidad experimental.
5. Previamente al depósito de las muestras en los frascos plásticos, se deberán filtrar las muestras usando un colador o tela filtro que se encuentre estéril.
6. A continuación se taparán las muestras para evitar perdida de líquido.
7. Estas lecturas se las realizarán una por cada unidad experimental (bandeja plástica).
8. Se registrarán los datos obtenidos en el formato #001 (Ver anexos)
9. Finalmente se transportarán las muestras a un laboratorio de Suelos y Aguas, en este caso al laboratorio de Suelos de la Universidad Politécnica Salesiana, Cayambe en función de continuar con el análisis de Nitritos y Nitratos.

6.1.9 **Análisis de Laboratorio.**

a) Test de Nitritos NO^-_2 para agua.

Método: Test de nitritos Merckoquant

Tabla 11 Nitritos NO^-_2: Protocolo para análisis de laboratorio.

Muestra preparada (15-25 °C) Reactivo NO^-_2	5,0 ml 1 micro cuchara rasa (kit-Merck)	Pipetear en un tubo de ensayo Añadir y agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente
Dejar en reposos 10 min. (Tiempo de reacción), luego introducir la muestra de medición en la cubeta y medir en el fotómetro.		

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

- Procedimiento análogo a EPA 354.1, US Standard Methods 4500-NO-2$^-$ B y EN 26 777.
- En solución acida los iones nitrito forman con el ácido sulfanílico una sal de diadiazonio que reacciona con el diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina dando un azocolorante violeta rojizo. Este colorante se determina fotométricamente.

Lectura de la muestra:

- Se procedió al análisis de las muestras, lo más rápido posible después de haberlas tomado en campo.
- Se comprobó el contenido de nitritos con el test nitritos, (Método: Test de nitritos Merckoquant).
- Se debe colocar en el fotómetro Nova-60 el código de barras correspondiente al test nitritos.
- Posteriormente ingresar las muestras al Nova-60, cuantificar el contenido de nitritos.
- Las muestras con más de 3,28 mg/L de NO^-_2 se diluirán con agua destilada.
- El valor del pH. Debe encontrarse en el intervalo de 2-10
- Si es necesario, ajustar con solución de hidróxido sódico o con ácido sulfúrico.

Consideraciones:

- Para la medición fotométrica las cubetas deben estar limpias
- Filtrar las muestras de agua demasiado turbias, las aguas turbias pueden llegar a dar valores errados.
- El valor de pH de la solución de medición debe estar entre 2,0-2,5.
- El color de la solución de medición permanece estable al menos 60 min. Posteriores a la reacción.
- Cerrar inmediatamente el frasco posterior a la toma del reactivo.

b) Test de Nitratos NO^{-}_{3} para agua

Método: Test de nitratos Merckoquant

Tabla 12. **Nitritos NO^{-}_{2}: Protocolo para análisis de laboratorio.**

Reactivo NO^{-}_{3} $^{-}$ 1 Reactivo NO^{-}_{3} $^{-}$ 2 Muestra preparada (15-25)°C	1 micro cuchara rasa (kit-Merckoquant) 5,0 ml 1,5 ml	Introducir un tubo de ensayo seco. Añadir con pipeta y agitar vigorosamente durante 1 min. Hasta que el reactivo NO^{-}_{3} se halla disuelto completamente. Verter muy lenta y cuidadosamente mediante pipeta sobre el reactivo en la pared interna del tubo de ensayo mantenido inclinado. Usando gafas protectoras, agitar inmediatamente y vigorosamente agarrando el tubo solo por la parte superior.
Dejar en reposos 10 min. (Tiempo de reacción), no refrigerar con agua fría, luego introducir la muestra de medición en la cubeta y medir en el fotómetro.		

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

- El ácido sulfúrico concentrado los iones nitrato forman con un derivado del ácido benzoico un nitrocompuesto rojo que se determina fotométricamente.

Lectura de la muestra:

- Se procedió al análisis de las muestras, lo más rápido posible después de haberlas tomado en campo.
- Se comprobó el contenido de nitratos con el test nitratos, (Método: Test de nitratos Merckoquant).
- Se debe colocar en el fotómetro Nova-60 el código de barras correspondiente al test nitratos.
- Ingresar las muestras al Nova-60, para cuantificar el contenido de nitritos.
- Las muestras con más de 20 mg/L de NO^{-}_{3} se diluirán con agua destilada.

Consideraciones:

- Filtrar las muestras de agua demasiado turbias.
- Para la medición fotométrica las cubetas deben estar limpias
- Aguas turbias pueden llegar a dar valores errados
- El color de la solución de medición permanece estable al menos 60 min. Posteriores a la reacción.
- Cerrar inmediatamente el frasco posterior a la toma del reactivo.

c) Nitrógeno total o Proteína en la planta (%).

Para dicho análisis se procedió a realizar un ensayo de tipo proximal como el utilizado en muestras alimenticias de consumo humano, para lo cual se utiliza el protocolo dado por el INIAP. (Ensayo #11-110, 2011).

Para determinar la composición química de los helechos acuáticos *Azolla* se realizó un análisis proximal. Para el cual se utilizó el método expuesto en la norma AOAC (1970) y en la compilación de datos analíticos y biológicos en la Preparación de Cuadros de Composición de Alimentos Para Uso en los Trópicos de América Latina (Universidad de Florida, 1970). (Chicaiza, 2009).

- Se tomó una muestra de cada una de las especies de helechos *Azolla*, que correspondió a 333 gramos para completar 1 kg. (INIAP). (Chicaiza, 2009).

- Las muestras fueron llevadas al laboratorio del Servicio de Análisis de Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

- Los parámetros y los métodos que se emplearon en el análisis proximal se expusieron en el Cuadro # 13.

Tabla 13. **Parámetros analizados y métodos utilizados en el Análisis Proximal.**

Parámetro	Unidad	Método/Norma
Humedad	%	MO-LSAIA-01.01
Cenizas	%	MO-LSAIA-01.02
Extracto etéreo	%	MO-LSAIA-01.03
Proteína cruda	%	MO-LSAIA-01.04
Fibra	%	MO-LSAIA-01.05
Elementos libres de nitrógeno	%	MO-LSAIA-01.06
Energía metabolizable	Mcal/kg	MO-LSAIA-16

Fuente: (Chicaiza, 2009).

Tabla 14. **Métodos para análisis químico realizado a las especies de helechos *Azolla*.**

Parámetro	Método	Descripción
Humedad	MO-LSAIA-01.01	El contenido humedad se determinó con el método expuesto en la norma AOAC (1970), para lo cual se usó una estufa de secado Shimatzu modelo 1995
Cenizas	MO-LSAIA-01.02	El contenido de cenizas se determinó de acuerdo con la norma AOAC (1970), para lo cual se usó una mufla Shimatzu modelo 1995.
Extracto Etéreo	MO-LSAIA-01.03	El contenido de grasa se determinó de acuerdo con el método expuesto en la norma AOAC (1970), para lo cual se usó un equipo extractor semiautomático de grasa Shimatza modelo 1995.
Proteína	MO-LSAIA-01.04	El contenido de proteína se determinó de acuerdo con el método expuesto en la Compilación de Datos Analíticos y Biológicos en la Preparación de Cuadros de Composición de Alimentos para Uso en los Trópicos de América Latina (1979), para lo cual se utilizó un equipo de digestión y destilación Macro – Kjeldahl Shimatzu modelo 1995
Fibra	MO-LSAIA-01.05	La fibra cruda se determinó de acuerdo con el método expuesto en la norma AOAC (1979), para lo cual se usaron los equipos, materiales y reactivos recomendados en la norma.
Elementos libres de nitrógeno	MO-LSAIA-01.06	Los elementos libres de nitrógeno se determinaron mediante el método expuesto en la Compilación de Datos Analíticos y Biológicos en la Preparación de Cuadros de Composición de Alimentos Para Uso en los Trópicos de América Latina (1979)

Fuente: (Chicaiza, 2009).

6.1.10 **Manejo de Desechos**

Para poder cuantificar los diferentes análisis, se hizo reaccionar la muestra acuosa en su mayoría con reactivos correspondientes a ácidos y bases, por tal motivo se sugirió proceder a su eliminación siguiendo las siguientes recomendaciones:

• Ácidos y bases. Los ácidos y las bases inorgánicas (excepto los cianuros) se deberán neutralizar antes de ser agregadas al desagüe, para lo cual se deberá usar agentes neutralizantes como el carbonato de calcio y el ácido clorhídrico. (Universidad de Antioquia, 2004)

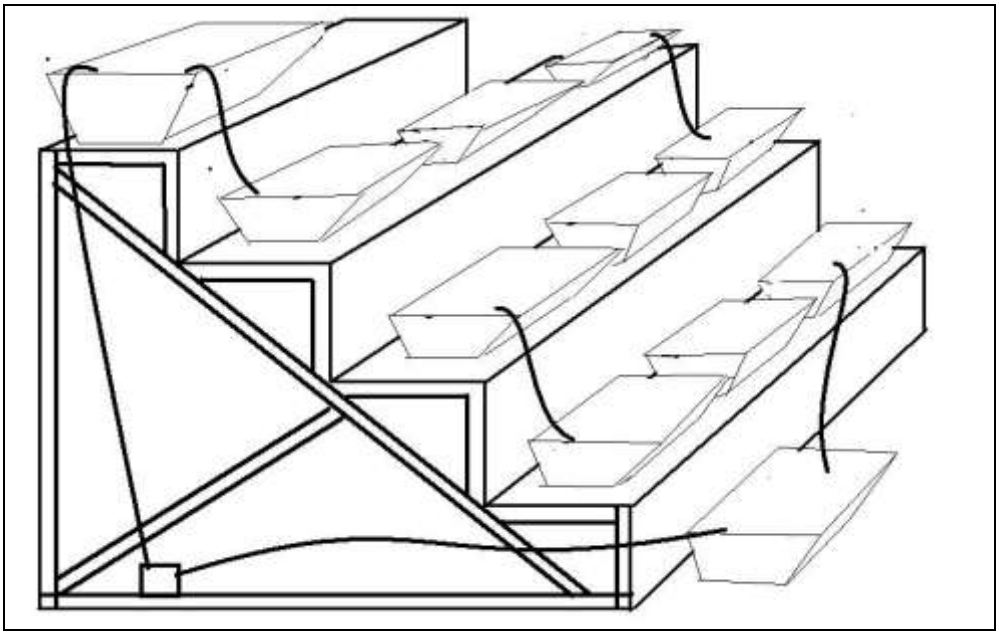


Imagen 10. Modelo de recirculación de agua.
Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 **Toma de Muestra acuosa para cuantificar los parámetros químicos y biológicos del agua de cultivo de *Azolla*.**

Ensayo N#. **1**
Nombre del Ensayo: **Agua Inicial**
Objetivo: Cuantificar los parámetros químicos y biológicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla.*
Fecha: Febrero-2011.
Lugar: Comunidad "Santa Rosa de la Compañía"

La evaluación de los parámetros químicos y biológicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla* situado en la comunidad "Santa Rosa de la Compañía" marca el inicio del cultivo, el sustrato acuoso lo componen principalmente muestras de agua filtrada proveniente de 3 reservorios representativos de la zona de Cayambe ubicados en Paquiestancia, Cayambe y Santa Rosa de la Compañía. Los análisis son realizados en el laboratorio de suelos y aguas de la Universidad Politécnica Salesiana ubicado en Cayambe. La cantidad de muestra es de 2 litros.

Tabla 15. Parámetros Físicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla*. Santa Rosa de la Compañía / 2011.

Código	Id. Campo	Temperatura °C (ingreso a laboratorio)	pH (ingreso a laboratorio)	Conductividad (dS/m)	Sólidos totales (mg/l)	Calcio (mg/l)	Magnésio Mg (mg/l)	K (mg/l)
LS-11-36	TESIS	1.860	751	9	4.500	3.530	2.640	300
Niveles permisibles			6.50 - 8.50 *	< 2.00 *	< 1000.00 *	300.00 *		20.00*

Fuente: La investigación, informe #21, Laboratorio de Suelos y Aguas UPS, 2011
Elaborado por: El Autor.

En la Tabla #15. Se interpretan los siguientes factores físicos:

- Temperatura: 18,60°C, se debe a que el sitio del experimento se encuentra cubierto con techo de plástico, lo que ocasiona una temperatura ascendiente hasta el medio día. Los meses en los que se llevó a cabo el ensayo son Noviembre 2010, Febrero 2011.
- pH: 7,51 refleja la neutralidad del agua, es decir los parámetros encontrados se deberán a la presencia del helecho *Azolla* en el agua de cultivo.
- Conductividad: 9,00 dS/m, refleja que el agua posee baja concentración de sales disueltas, baja conducción de la corriente eléctrica es decir baja contaminación.
- Sólidos Totales: 4.500 mg/l. refleja la baja concentración de sólidos, es decir existe baja concentración de materia orgánica disuelta, alta luminosidad, buena dispersión de la temperatura.
- Calcio y Magnesio: 3,530 mg/l. y 2.640 mg/l. Define el hecho de que el agua de la muestra es alta en minerales, es decir posee alta dureza en lo referente a Ca. y Mg.
- Potasio: (300 mg/l.) Nos indica que la fuente de donde se tomó el agua es subterránea, pues su concentración es alta.

Tabla 16. Parámetros químicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla*. Santa Rosa de la Compañía / 2011.

Código	Id. Campo	Nitratos NO_3 (mg/l)	Nitritos NO_2 (mg/l)	Fosfatos PO_2 (mg/l)	Sulfatos SO_4 (mg/l)	Hierro Fe (mg/l)	Manganeso Mn (mg/l)	Zinc Zn (mg/l)
LS-11-36	TESIS	< 0.50	< 0.02	< 1.00	< 25.00	< 0.05	< 0.50	25
Niveles permisibles		< 10.00 *	0.00 *	< 0.10 *	< 200.00 *	< 0.30 *	< 0.10 *	< 0.30 *

Fuente: La investigación, informe #21, Laboratorio de Suelos y Aguas UPS, 2011
Elaborado por: El Autor.

- Se refleja en la Tabla #16 que la muestra acuosa posee existencia de minerales en cuanto a factores como Nitratos (<0,5), Nitritos (<0,02), Fosfatos (<1,00), sulfatos (<25,00), Hierro (<0,05) y Manganeso (<0,50) que se encuentran dentro de los niveles permisibles; considerando como referencia el agua de consumo humano.
- El único elemento en alta concentración es el Zinc (25,00) con lo que el sabor del agua varía como propiedad organoléptica lo cual no se considera un riesgo pues el Zn es poco tóxico.

Tabla 17. Parámetros Microbiológicos en la muestra inicial de agua de cultivo de *Azolla*. Santa Rosa de la Compañía / 2011.

Código	Id. Campo	Microorganismos aerobios mesófilos	Coliformes totales NMP/ml	*E. coli*
LS-11-36	TESIS	25	< 3	Ausente
Niveles permisibles		30 ª	2 ª	Ausente

Fuente: La investigación, informe #21 del Laboratorio de Suelos y Aguas UPS, 2011
Elaborado por: El Autor.

Se encontró en la Tabla #17 que la muestra de agua inicial se considera apta para el crecimiento de *Azolla*, como cultivo. Además los parámetros químicos no presentan exceso de minerales y los parámetros microbiológicos no presentan unidades formadoras de colonias, todo esto considerando como referencia el agua de consumo humano.

Dentro de las normas utilizadas para el presente análisis constan las siguientes:

a) Guías de calidad del agua de bebida de la O.M.S. – 3ra edición - 2002
b) INEN – norma agua potable – requisitos – 1108:1983
nmp= número más probable. (Laboratorio de aguas y suelos-UPS, 2011)

6.2.2 **Toma de Muestras vegetales para cuantificar el crecimiento de *Azolla*.**

Ensayo N#. **2**
Nombre del Ensayo: **Crecimiento de *Azolla*.**
Objetivo: Cuantificar el crecimiento de *Azolla.*
Fecha: Febrero-2011.
Lugar: Comunidad "Santa Rosa de la Compañía"

La evaluación del crecimiento del *Azolla* en la comunidad "Santa Rosa de la Compañía" tomó en consideración la siembra, el 12 de Febrero del 2011, de 10 g. de Azolla Cayambe (**z_1**), 10 g. de Azolla Guayas (**z_2**) y 10 g. de Azolla Paquiestancia (**z_3**). Cubrió una superficie de 219 cm^2. Después de 12 días, el 24 de Febrero, *Azolla* revistió el 100 % de los 525 cm^2 de la bandeja plástica de prueba.

*Para fines de cálculo 1 cm^2 de *Azolla* equivale a 0,046 g. de *Azolla* fresca.
*A partir de los datos tomados en campo se obtiene la siguiente información:

Especie z_1	Superficie (cm^2)	Masa (g.)
Inicial	219	10
Final	525	17,14

Especie z_2	Superficie (cm^2)	Masa (g.)
Inicial	219	10
Final	525	16,50

Especie z_3	Superficie (cm^2)	Masa (g.)
Inicial	219	10
Final	525	15,08

La velocidad de crecimiento del *Azolla* (d_m/d_t) obedecería a una expresión matemática típica de crecimiento en la que dicha velocidad es proporcional (k) a la masa (m) en cada momento (Macías N., Maruri J., Sánchez F., Montaño M., 2010), es decir:

$$\mathbf{d_m/d_t = km}$$

Por tanto $d_m/m = kd_t$
Que integrando da $\ln (m_f/m_i) = kt$
Que remplazando con valores queda

$$\mathbf{\ln (17,14/10) = 12k}$$

$kz_1 = 0,045/d$; $kz_2 = 0,042/d$; $kz_3 = 0,034/d$

k representa la constante de crecimiento de *Azolla* en la comunidad "Santa Rosa de la Compañía".

De la misma fórmula general se puede calcular el tiempo de duplicación de la masa (t_2)

$$\mathbf{\ln (2m_f/m_i) = 0{,}045\ t2z_1}$$

$t2z_1$= ln2/0,045; $t2z_2$= ln2/0,042; $t2z_3$= ln2/0,034

$t2z_1$= 15,40 días; $t2z_2$= 16,50 días; $t2z_3$= 20,38 días

La productividad (P) se establece entre el aumento de masa (Δ_m), el tiempo (t) y el área media representativa (A_m). Los valores de estas características son:

$$\mathbf{\Delta_m = m_f - m_i}$$

$\Delta_m z_1$ = 17,14g - 10g $\Delta_m z_2$ = 16,50g - 10g $\Delta_m z_3$ = 15,08g - 10g

$\Delta_m z_1$ = 7,14g $\Delta_m z_2$ = 6,50g $\Delta_m z_3$ = 5,08g

Siendo **t =12 días**

$\mathbf{A_m}$ **= (525 +219)/2 cm^2**
= 372 cm^2

$\mathbf{P = \Delta_m/t/A_m}$

Pz_1 = (7,14 g/12 días/372 cm^2) = 0,0016 g/día/cm^2
= (0,0714kg/12 días/0,0372 m^2) = 0,016 kg/día/m^2
= (0,0000714t/12días/0,00000372 ha= 0,16 t/día/ha

Pz_2 = (6,50 g/12 días/372 cm2) = 0,0015 g/día/cm^2
= (0,0650kg/12 días/0,0372 m^2) = 0,015 kg/día/m^2
= (0,0000650t/12días/0,00000372 ha= 0,15 t/día/ha

Pz_3 = (5,08 g/12 días/372 cm^2) = 0,0011 g/día/cm^2
= (0,0508kg/12 días/0,0372 m^2) = 0,011 kg/día/m^2
= (0,0000508t/12días/0,00000372 ha= 0,11 t/día/ha

Tabla 18. Resultados: Crecimiento de *Azolla*.

kz_1 = 0,045/día	kz_2 = 0,042/día	Kz_3 = 0,034/día
$t2z_1$ = 15,40 días	$t2z_2$ = 16,50 días	$t2z_3$ = 20,38 días
Pz_1 = 0,16 t/día/ha	Pz_2 = 0,15 t/día/ha	Pz_3 = 0,11 t/día/ha

6.2.3 **Toma de Muestra vegetal para el correspondiente análisis proximal de *Azolla.***

Ensayo N#.	**3**
Nombre del Ensayo:	**Análisis Proximal**
Objetivo:	Cuantificar analítica y biológicamente una muestra vegetal de *Azolla.*
Fecha:	Marzo / 2011.
Lugar:	Comunidad "Santa Rosa de la Compañía"

La evaluación de los parámetros analíticos y biológicos de la muestra vegetal de *Azolla* continúa al proceso investigativo. De manera que se evalúan tres diferentes muestras correspondientes, la primera cultivada en la comunidad "Santa Rosa de la Compañía". Los análisis son realizados en el laboratorio de Servicios de análisis e investigación de alimentos, del departamento de Nutrición y Calidad perteneciente al Instituto de Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. La cantidad unificada de muestra es de 1 Kilogramo.

Tabla 19. Parámetros Biológicos correspondientes al análisis proximal de una muestra vegetal de de *Azolla* Santa Rosa de la Compañía / 2011.

ANÁLISIS	HUMEDAD	CENIZAS Ω	E.E. Ω	PROTEÍNA Ω	FIBRA Ω	E.L.N. Ω	IDENTIFICACIÓN
MÉTODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03	MO-LSAIA-01.04	MO-LSAIA-01.05	MO-LSAIA-01.06	
METODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	
UNIDAD	%	%	%	%	%	%	
11-0306	97,34	8,10	2,50	3,42	24,95	61,04	HELECHO ACUÁTICO

Fuente: La investigación, informe #11-110, Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos-INIAP, 2011
Elaborado por: El Autor.

De esta manera se observo que la muestra vegetal de *Azolla* logra un porcentaje absoluto de humedad de (97,34%), en cuanto a materia orgánica o Cenizas presente en la muestra, este es alto con (8,10%). Respecto de Extracto etéreo o grasa, la muestra alcanza un nivel bajo con (2,50%). En cuanto a proteína la muestra presenta un valor considerable con (3,42%). La Fibra en la muestra se considera alta con (24,95%). Los elementos libres de nitrógeno alcanzan un valor alto de (61,04%). Todo esto considerando como referencia alimentos de consumo animal en pequeñas especies.

Dentro de las normas utilizadas para el presente análisis constan las siguientes:

a) Guía según University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Animal Sciences departamento, 1970.
b) Los valores marcados con Ω son reportados en base seca (%MS.)

6.2.4 **Toma de Muestra acuosa para el análisis de Nitritos NO^-_2 correspondiente al medio de cultivo de *Azolla*.**

Ensayo N#. **4**
Nombre del Ensayo: **Nitritos NO^-_2**
Objetivo: -Cuantificar la cantidad de nitritos presentes en el agua como medio de cultivo de *Azolla.*
-Analizar estadísticamente los valores encontrados.
Fecha: Marzo / 2011.
Lugar: Comunidad "Santa Rosa de la Compañía"

En un proceso experimental se evaluó 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla*: *(z_1) Azolla mexicana, (z_2) A. caroliniana, (z_3) A. filiculoides* y 3 diferentes dosis de aplicación en el cultivo (10, 15, 20) g. Se utiliza un Diseño de Bloques Completos al Azar con 3 repeticiones. Además se consideró necesario evaluar un tratamiento adicional correspondiente a Agua sin el helecho acuático *Azolla*, la variable evaluada fue: miligramos de Nitrito fijados por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/L)

DATOS:

Diseño utilizado: *DBCA con arreglo factorial 3x3+1*
Repeticiones: *3*
Factores y niveles en estudio: * 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla: (z_1) Azolla mexicana* denominada Azolla Cayambe.
(z_2) A. caroliniana denominada Azolla Guayas.
(z_3) A. filiculoides denominada Azolla Paquiestancia.

* 3 diferentes dosis de aplicación en el cultivo:
(b_1) 10 g.
(b_2) 15 g.
(b_3) 20 g.

Número de tratamientos adicionales: Agua sin el helecho acuático *Azolla.*
Número de unidades experimentales: 30
Número de tratamientos: 10

$T_1 = z_1b_1$
$T_2 = z_1b_2$
$T_3 = z_1b_3$
$T_4 = z_2b_1$
$T_5 = z_2b_2$
$T_6 = z_2b_3$
$T_7 = z_3b_1$
$T_8 = z_3b_2$
$T_9 = z_3b_3$
$T_{10} = z_0b_0$ (Agua sin el helecho acuático *Azolla* ó con dosis de aplicación 0 g).

Variables: Miligramos de Nitrito fijados por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/L)

Tabla 20. **Miligramos de Nitrito fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/L).**

En la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación en el cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

<0,02

Tratamientos	Repeticiones			Σ Tratamientos	X Tratamientos
	I	II	III		
b_1z_1	0,020	0,020	0,030	0,070	0,023
b_1z_2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b_1z_3	0,020	0,020	0,020	0,060	0,020
b_2z_1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b_2z_2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b_2z_3	0,020	0,020	0,020	0,060	0,020
b_3z_1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b_3z_2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b_3z_3	0,020	0,020	0,020	0,060	0,020
z_0b_0 (Agua sin el helecho acuático *Azolla*)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Σ de Repeticiones	0,060	0,060	0,060	0,180	
					0,008

Fuente: La investigación, informe #17, Laboratorio de Suelos y Aguas UPS, 2011
Elaborado por: El Autor.

Tabla 21. **Miligramos de Nitrito fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/L).**

En el que se observa el efecto de cada factor por separado (factorial), en la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación de cultivo, sin tomar en cuenta un tratamiento adicional consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

Especies de Helecho acuático *Azolla*	Dosis de aplicación en el cultivo			Σ Especies	X Especies
	b_1	b_2	b_3		
z_1	0,070	0,000	0,060	0,130	0,014
z_2	0,000	0,000	0,060	0,060	0,007
z_3	0,000	0,000	0,060	0,060	0,007
Σ de Dosis	0,070	0,000	0,180	0,250	
X de Dosis	0,008	0,000	0,020		0,009

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

**Al observar los cuadros 20 y 21 se determina que la mejor interacción es z_1b_1 con un promedio de 0,023 mg NO^-_2/L, mientras que para los factores por separado los mejores son el primer nivel para especies (z_1) y el primer nivel para dosis (b_3), con un promedio de 0,014 y 0,020 (mg. NO^-_3/l.) respectivamente. Además al comparar el promedio general del factorial (Agua con el helecho acuático *Azolla*) con el promedio del tratamiento adicional (Agua sin el helecho acuático *Azolla*), se observa que la mejor respuesta la tiene el agua con el helecho acuático *Azolla* con un promedio de 0,009 (mg. NO^-_2/L), frente al Agua sin el helecho acuático *Azolla* con un promedio de 0,008 (mg. NO^-_2/L) que presenta el tratamiento adicional.

Tabla 22. ADEVA para miligramos de Nitrógeno atmosférico NO^-_2.

Fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/L) en la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación de cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

FV	GL	SC	CM	Fcal.		F tab.	F tab.
						5%	1%
Total	29,000	0,004					
Tratamiento	9,000	0,004	0,00046	138,444	**	2,390	3,460
Especies de Helecho acuático *Azolla*	2,000	0,000	0,00018	54,444	**	3,490	5,850
Dosis de aplicación en el cultivo	2,000	0,002	0,00091	274,444	**	3,490	5,850
Especies x Dosis	4,000	0,001	0,00018	54,444	**	2,870	4,430
Agua con el helecho acuático *Azolla* **VS.** Agua sin el helecho acuático *Azolla*	1,000	0,001	0,00123	370,444	**	4,350	8,100
Repeticiones	2,000	0,000	0,0000000	0,000	ns	3,490	5,850
Error Experimental	20,000	0,000	0,0000033				

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

*Al tratarse de un proceso experimental que posee factorial, no resulta interesante realizar la prueba de significancia para **TRATAMIENTOS** cuando en este caso se ha calificado con **(**),** pues el proceso ya se encuentra desdoblado en sus diferentes factores e interacciones.

*Al calificarse el factor **Dosis de aplicación en el cultivo** con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso Tukey al 5%.

RANQUEO PARA DOSIS

Tabla 23. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrito.

Fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_2/L) en la evaluación de 3 Dosis de cultivo del helecho acuático *Azolla*.

Tratamientos	X de Tratamiento	Rango definitivo
b_3 (20 g) C	0,014	a
b_1 (10 g) A	0,007	ab
b_2 (15 g) B	0,007	b

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

*Al calificarse el factor **Especies de Helecho Acuático** *Azolla* con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso Tukey al 5%.

RANQUEO PARA ESPECIES

Tabla 24. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrito fijado por litro de agua de cultivo (mg. NO^-_2/l) en la evaluación de 3 especies del helecho acuático *Azolla*.

Tratamientos	X de Tratamiento	Rango definitivo
z_1 A	0,020	a
z_3 C	0,008	b
z_2 B	0,000	c

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

*Al calificarse la interacción **Especies x Dosis** con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso Tukey al 5%.

RANQUEO PARA LA INTERACCIÓN ESPECIES Vs. DOSIS

Tabla 25. **Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrito.**

Fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^{-}_{2}/L) en la evaluación de la interacción de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* Vs. 3 Dosis de Aplicación de Cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo. (z_0b_0)

Tratamientos		X de Tratamiento	Rango definitivo
$\mathbf{b_1z_1}$	a	0,023	a
$\mathbf{b_1z_3}$	e	0,020	a
$\mathbf{b_2z_3}$	b	0,020	a
$\mathbf{b_3z_3}$	f	0,020	a
$\mathbf{b_2z_2}$	g	0,000	b
$\mathbf{b_1z_2}$	c	0,000	b
$\mathbf{b_2z_1}$	h	0,000	b
$\mathbf{b_3z_1}$	i	0,000	b
$\mathbf{b_3z_2}$	d	0,000	b

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

*Al calificarse el factorial **Agua con el helecho acuático *Azolla* VS. Agua sin el helecho acuático *Azolla*** con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso DMS.

RANQUEO PARA EL FACTORIAL Agua con *Azolla* Vs. Agua sin *Azolla*.

Tabla 26. **Prueba de Tukey al 5% para el factorial Agua con *Azolla* Vs. Agua sin *Azolla.***

En la evaluación de miligramos de Nitrito fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^{-2}/L)

Tratamientos	X de Tratamiento	Rango definitivo
z_1b_1 (A)	0,009	a
z_0b_0 (B)	0,008	a

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

6.2.5 **Toma de Muestra acuosa para el análisis de Nitratos NO^-_3 correspondiente al medio de cultivo de *Azolla*.**

Ensayo N#.	**5**
Nombre del Ensayo:	**Nitratos NO^-_3**
Objetivo:	-Cuantificar la cantidad de nitratos presentes en el agua como medio de cultivo de *Azolla.* -Analizar estadísticamente los valores encontrados.
Fecha:	Marzo / 2011.
Lugar:	Comunidad "Santa Rosa de la Compañía"

En un proceso experimental se evaluó 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla*: (z_1) *Azolla mexicana,* (z_2) *A. caroliniana,* (z_3) *A. filiculoides* y 3 diferentes dosis de aplicación en el cultivo (10, 15, 20) g. Se utiliza un Diseño de Bloques Completos al Azar con 3 repeticiones. Además se consideró necesario evaluar un tratamiento adicional correspondiente a Agua sin el helecho acuático *Azolla*, la variable evaluada fue: miligramos de Nitrito fijados por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/L)

DATOS:

Diseño utilizado:	DBCA con arreglo factorial 3x3+1
Repeticiones:	3
Factores y niveles en estudio:	* 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla*: (z_1) *Azolla mexicana* denominada Azolla Cayambe. (z_2) *A. caroliniana* denominada Azolla Guayas. (z_3) *A. filiculoides* denominada Azolla Paquiestancia. * 3 diferentes dosis de aplicación en el cultivo: (b_1) 10 g. (b_2) 15 g. (b_3) 20 g.
Número de tratamientos adicionales:	Agua sin el helecho acuático *Azolla.*
Número de unidades experimentales:	30
Número de tratamientos:	10
$T_1 = z_1b_1$	
$T_2 = z_1b_2$	
$T_3 = z_1b_3$	
$T_4 = z_2b_1$	
$T_5 = z_2b_2$	
$T_6 = z_2b_3$	
$T_7 = z_3b_1$	
$T_8 = z_3b_2$	
$T_9 = z_3b_3$	
$T_{10} = z_0b_0$	(Agua sin el helecho acuático *Azolla* ó con dosis de aplicación 0 g).
Variables:	Miligramos de Nitrito fijados por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/L)

Tabla 27. Miligramos de Nitrato fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/L)

En la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación en el cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

<0,5

Tratamientos	Repeticiones			Σ Tratamientos	X Tratamientos
	I	II	III		
b_1z_1	0,300	0,100	0,300	0,700	0,233
b_1z_2	0,515	0,500	0,400	1,415	0,472
b_1z_3	0,300	0,000	0,000	0,300	0,100
b_2z_1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b_2z_2	0,700	0,600	0,400	1,700	0,567
b_2z_3	0,000	0,300	0,000	0,300	0,100
b_3z_1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b_3z_2	0,100	0,100	0,033	0,233	0,078
b_3z_3	0,100	0,000	0,000	0,100	0,033
z_0b_0 (Agua sin el helecho acuático *Azolla*)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Σ de Repeticiones	1,715	1,500	0,833	4,048	
					0,158

Fuente: La investigación, informe #17, Laboratorio de Suelos y Aguas UPS, 2011
Elaborado por: El Autor.

Tabla 28. Miligramos de Nitrato fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/l).

En el que se observa el efecto de cada factor por separado (factorial), en la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación de cultivo, sin tomar en cuenta un tratamiento adicional consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

Especies de Helecho acuático *Azolla*	Dosis de aplicación en el cultivo			Σ Especies	X Especies
	b_1	b_2	b_3		
z_1	0,700	1,415	0,300	2,415	0,268
z_2	0,000	1,700	0,300	2,000	0,222
z_3	0,000	0,233	0,100	0,333	0,037
Σ de Dosis	0,700	3,348	0,700	4,748	
X de Dosis	0,078	0,372	0,078		0,176

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

** Al observar los cuadros 27 y 28 se determina que la mejor interacción es z_2b_2 con un promedio de 0,567 mg NO^-_3/L, mientras que para los factores por separado los mejores son el primer nivel para especies (z_1) y el primer nivel para dosis (b_3), con un promedio de 0,014 y 0,013 (mg. NO^{-3}/L) respectivamente. Además al comparar el promedio general del factorial (Agua con el helecho acuático *Azolla*) con el promedio del tratamiento adicional (Agua sin el helecho acuático *Azolla*), se observa que la mejor respuesta la tiene el agua con el helecho acuático *Azolla* con un promedio de 0,009 (mg. NO^-_3/L), frente al Agua sin el helecho acuático *Azolla* con un promedio de 0,008 (mg. NO^-_3/L) que presenta el tratamiento adicional. Esta investigación necesita tener un soporte científico, por lo que se hace necesario realizar un análisis de varianza. (Ver Cuadro 27.)

Tabla 29. ADEVA para miligramos de Nitrato NO^-_3.

Fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/l) en la evaluación de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* y 3 Dosis de aplicación de cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo.

FV	GL	SC	CM	Fcal.		F tab. 5%	F tab. 1%
Total	29,000	1,540					
Tratamiento	9,000	1,329	0,148	17,530	**	2,390	3,460
Especies de Helecho acuático *Azolla*	2,000	0,270	0,135	16,014	**	3,490	5,850
Dosis de aplicación en el cultivo	2,000	0,519	0,260	30,823	**	3,490	5,850
Especies x Dosis	4,000	0,251	0,063	7,457	**	2,870	4,430
Agua con el helecho acuático *Azolla* VS. Agua sin el helecho acuático *Azolla*	1,000	0,289	0,289	34,270	**	4,350	8,100
Repeticiones	2,000	0,042	0,021	2,510	ns	3,490	5,850
Error Experimental	20,000	0,169	0,008				

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

*Al tratarse de un proceso experimental que posee factorial, no resulta interesante realizar la prueba de significancia para **TRATAMIENTOS** cuando en este caso se ha calificado con **(**),** pues el proceso ya se encuentra desdoblado en sus diferentes factores e interacciones.
*Al calificarse el factor **Dosis de aplicación en el cultivo** con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso Tukey al 5%.

RANQUEO PARA DOSIS

Tabla 30. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrato.

Fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/l) en la evaluación de 3 Dosis de cultivo del helecho acuático *Azolla*.

Tratamientos	X de Tratamiento	Rango definitivo
b_1(10 g) A	0,268	a
b_2 (15 g) B	0,222	b
b_3 (20 g) C	0,037	b

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

*Al calificarse el factor **Especies de Helecho Acuático** *Azolla* con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso Tukey al 5%.

RANQUEO PARA ESPECIES

Tabla 31. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrato.

Fijado por litro de agua de cultivo. (mg.NO^-_3/l) en la evaluación de 3 especies del helecho acuático *Azolla*.

Tratamientos	X de Tratamiento	Rango definitivo
z_2 (B)	0,372	a
z_1 (A)	0,078	b
z_3 (C)	0,078	b

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

*Al calificarse la interacción **Especies x Dosis** con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso Tukey al 5%.

RANQUEO PARA LA INTERACCIÓN ESPECIES Vs. DOSIS

Tabla 32. Prueba de Tukey al 5% para miligramo de Nitrato.

Fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/L) en la evaluación de la interacción de 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* Vs. 3 Dosis de Aplicación de Cultivo, tomando en cuenta un tratamiento adicional, consistente en Agua sin el helecho acuático *Azolla* como cultivo. (z_0b_0).

Tratamientos		X de Tratamiento	Rango definitivo
$\mathbf{b_2z_2}$	E	0,567	a
$\mathbf{b_1z_2}$	B	0,472	a
$\mathbf{b_1z_1}$	A	0,233	a
$\mathbf{b_1z_3}$	C	0,100	b
$\mathbf{b_2z_3}$	F	0,100	b
$\mathbf{b_3z_2}$	H	0,078	b
$\mathbf{b_3z_3}$	I	0,033	b
$\mathbf{b_2z_1}$	D	0,000	b
$\mathbf{b_3z_1}$	G	0,000	b

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

** Al observar el cuadro 32. Se ranquea la Interacción entre 3 especies del helecho acuático de nombre *Azolla* Vs. 3 Dosis de Aplicación de Cultivo, se detectan 2 rangos de significancia, encontrándose en el primero, rango (a), 3 tratamientos (E, B y A), en el segundo, rango (b), 6 tratamiento (C, F, H, I, D y G), es así que la mejor respuesta para miligramo de Nitrato fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^-_3/L) resultan todos los tratamientos ranqueados con la letra (a), correspondientes a Azolla Guayas en dosis de 10 g. y 15 g., y Azolla Cayambe en dosis de 10 g.

*Al calificarse el factorial **Agua con el helecho acuático *Azolla* VS. Agua sin el helecho acuático *Azolla*** con (**), se debe realizar la prueba de significancia; en este caso DMS.

RANQUEO PARA EL FACTORIAL agua con *Azolla* vs. agua sin *Azolla.*

Tabla 33. Prueba de Tukey al 5% para el factorial Agua con *Azolla* Vs. Agua sin *Azolla.*

En la evaluación de miligramos de Nitrato fijado por litro de agua de cultivo. (mg. NO^{-}_{3}/L)

Tratamientos	X de Tratamiento	Rango definitivo
z_1b_1 (A)	0,176	a
z_0b_0 (B)	0,158	a

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

DISCUSIÓN

En cuanto a la interacción entre: especies del helecho acuático cultivado y sus correspondientes dosis de cultivo (cantidad en gramos), se observa que para la fijación de nitrito (mg. NO^-_2/l H_2O) y nitrato (mg. NO^-_3/l H_2O) se obtiene como resultado dos rangos de significancia. Siendo las mejor ranqueadas para nitrito las interacciones: Azolla Guayas con 10 g. (0,023 mg./l), Azolla Paquiestancia con 10 g. (0,020 mg./l) y Azolla Paquiestancia con 15 g. (0,020 mg./l). Y para nitrato las interacciones: Azolla Guayas con 15 g. (0,567 mg./l), Azolla Guayas con 10 g. (0,472 mg./l y Azolla Cayambe con 10 g. (0,233 mg./l).

Al analizar el factorial Agua con *Azolla* como cultivo Vs. Agua sin *Azolla* como cultivo, se encontró que ambos tratamientos se ubican en un solo nivel de ranqueo. Y con ello se deriva que la fijación de nitritos y nitratos no dependió directamente de la presencia de *Azolla* como cultivo al momento de la fijación de nitrógeno atmosférico.

Azolla puede potenciar materias primas de bajo valor nutricional utilizadas como sobrealimento exclusivo para consumo animal, pudiéndose realizar análisis más profundos para determinar formulaciones alimenticias, a fin de conocer que composición nutricional, etapa y especie se podrían beneficiar de *Azolla* como materia prima de origen vegetal y constituyente de su dieta.

7. CONCLUSIONES

Las características físicas del agua de cultivo demuestran baja concentración de materia orgánica (Sólidos Totales: 4.500 mg/l.), es decir buena dispersión de luz y temperatura (18,60°C); químicamente se reconoce alta concentración de minerales en lo referente a (Ca. 2.640 mg/l, Mg. 3,530 mg/l. y K. 300 mg/l.), lo que define el hecho de que el agua de la muestra es alta en minerales, enriquecida por procesos de percolación, es decir posee alta dureza, así como de que la fuente donde se origino fue de procedencia subterránea.

Químicamente se refleja que la muestra acuosa posee existencia de minerales en cuanto a factores como Nitratos (<0,5), Nitritos (<0,02), Fosfatos (<1,00), sulfatos (<25,00), Hierro (<0,05) y Manganeso (<0,50) que se encuentran dentro de los niveles permisibles. El único elemento en alta concentración es el Zinc (25,00) con lo que el sabor del agua varía como propiedad organoléptica lo cual no se considera un riesgo pues el Zn es poco tóxico. Considerándose que el cultivo se vería beneficiado de la existencia de estos elementos

Microbiológicamente no se encuentra saturación de unidades formadoras de colonias. Considerando de esta manera que los sistemas acuíferos de Cayambe son aptos para el cultivo de *Azolla.*

En el crecimiento de las tres especies de *Azolla* evaluadas, la que mejor resultado obtuvo fue el tratamiento z1 correspondiente a la especie *Azolla mexicana*, ya que alcanzó una constante de crecimiento (kz_1 = 0,045/día) que hace que duplique su tamaño en 15 días aproximadamente; correspondiendo la más productiva con 0,16 tonelada/ha/día.

La muestra vegetal de *Azolla*, alcanza un valor alto de humedad con 97,34%, la proteína presenta un valor considerable con 3,42%, la fibra en la muestra se considera alta con 24,95%, los elementos libres de nitrógeno (61,04%) considerado alto, la Materia orgánica o Cenizas alcanzada en la muestra es alta con (8,10%) y con ello se deduce que *Azolla* puede potenciar materias primas de bajo valor nutricional utilizadas como sobrealimento, respecto de las características nutricionales de un alimento exclusivo para consumo animal, sin especificarse en este estudio para que especie, edad ni en qué proporción se podría utilizar.

Para las dosis de cultivo de *Azolla*, se presentan dos rangos de significancia, siendo la mejor la correspondiente al uso de 20 gramos de cultivo del helecho acuático para nitritos y 10 gramos para nitratos. Mientras qué en el análisis de especies de *Azolla* resultó la mejor en cuanto a fijación de nitrito el tratamiento z1 correspondiente a la especie *Azolla mexicana* (0,020 mg. NO^-_2/l), y para nitrato el tratamiento z2 correspondiente a la especie *Azolla caroliniana* (0,372 mg.NO^-_3/l).

Aunque los datos no lo demuestran, la relación simbiótica de *Azolla-Anabaena* es eficiente en los ecosistemas de la zona de Cayambe, ya que; *Azolla* alcanzó fijación de nitrógeno atmosférico mediante la duplicación de materia orgánica y la fijación de nitritos y nitratos en el agua de cultivo en un tiempo aproximado de 15 días comparado con los 7 días que *Azolla* demora en la cuenca del río Guayas.

8. RECOMENDACIONES

Cultivar *Azolla* en la zona de Cayambe en sustrato acuoso de aguas superficiales, sean estas provenientes de acequias o de reservorios.

De las tres especies utilizadas, se recomienda *Azolla mexicana*, pues duplico su masa en 15 días, ya que esta especie se encuentra fácilmente en reservorios y afluentes pocos torrentosos del cantón Cayambe.

Por la concentración de proteína encontrada en *Azolla*, se recomienda utilizar las tres especies pues todas alcanzaron un nivel adecuado.

Para hacer un adecuado uso de la relación simbiótica *Azolla-Anabaena*, se recomienda cosechar las muestras vegetales al momento que el cultivo duplique su masa, de esta manera se potencia sus propiedades como fertilizante y abono verde para los cultivos.

9. RESUMEN

La presente investigación muestra la evaluación de 3 diferentes especies del helecho acuático *Azolla* en relación con la fijación de nitrógeno atmosférico en forma de nitritos (NO^-_2) y nitratos (NO^-_3) que sucede en el agua de cultivo de este helecho, su crecimiento y productividad en los ecosistemas acuáticos de la zona de Cayambe.

Los tratamientos empleados estudiaron las especies: *Azolla mexicana*, *A. caroliniana* y *A. filiculoides* que a su vez interactuaron con las dosis de cultivo a 10 g., 15 g. y 20 g. Y adicional a esto se incluyó un factorial con dosis a 0 g. que sirvió para determinar si la presencia o no del helecho acuático influyó en la fijación de estas dos especies químicas del nitrógeno al agua de cultivo.

Se evaluó el crecimiento de *Azolla*, el peso que alcanzó en gramos cada una de las 3 especies en estudio, y se determinó la productividad en toneladas / día por hectárea desde su cultivo hasta el día 12 de cosecha.

Respecto de la fijación de nitritos y nitratos, específicamente de la dosis de cultivo utilizada, los mejores tratamientos promediaron 15 g. de *Azolla* utilizada. En cuanto a las especies en estudio, las que presentaron mejores resultados fueron *Azolla mexicana* y *A. caroliniana*. Al momento de interactuar especies y dosis, no se presentó diferencias significativas.

Finalmente y desde la ejecución de los tratamientos, la fijación de nitritos y nitratos en el agua de cultivo no se vio influenciada por la presencia de *Azolla*, deduciendo que el verdadero potencial de este helecho se encuentra en su materia vegetal como fuente de proteína.

SUMMARY

This research shows the evaluation of 3 different species of aquatic fern *Azolla* in relation to the fixation of atmospheric nitrogen in the form of nitrite (NO^-_2) and nitrates (NO^-_3) happens in the culture water of this fern, growth and productivity in aquatic ecosystems in the area of Cayambe.

The treatments used studied species: *Azolla mexicana*, *A. caroliniana* and *A. filiculoides*, which in turn interacted with the dose of culture at 10 g., 15 g. and 20 g. And this additional factor was included at doses 0 g. served to determine the presence or absence of water fern influence in setting these two chemical species of nitrogen to water crops.

We evaluated the growth of *Azolla*, weight in grams that reached each of the 3 species studied, and determined the productivity in tons / day per hectare from cultivation to harvest on 12.

For the determination of nitrite and nitrate, specifically the dose of culture used the best treatments averaged 15 g. *Azolla* used. As for the species under study, which showed better results were *Azolla caroliniana* and *A. Mexican*. When interacting species and dose, did not show significant differences.

Finally, from the execution of the treatments, the setting of nitrites and nitrates in the culture water was not influenced by the presence of *Azolla*, deducing that the true potential of this fern is found in plant material as a source of protein.

10. BIBLIOGRFÍA.

ARMSTRONG, *Marriage Between A Fern & Cyanobacterium - El matrimonio entre un helecho y cianobacteria*, [En línea]. 1ra. Edición, Wayne's Word Noteworthy Plant For November 1998, Noviembre 1998, [Disponible en:] http://waynesword.palomar.edu/plnov98.htm> [Consulta: 24 Septiembre 2011].

BACA, B.; URZUA, M.; SOTO, P.; RUIZ P. *Fijación biológica de nitrógeno,* Universidad Autónoma de Puebla, 1ra. Edición, México, 2006, p.12.

CABEZAS, J; CABEZAS, I. 2007, *Implementación de una planta procesadora de Quesos en la comunidad Santa Rosa de La Compañía,* Monografía E.S.P.E. Dirección de Educación continua, Cayambe, 2009. p. 1 -17.

CARRAPIÇO, FRANCISCO, *Azolla as a superorganism. Its implication in symbiotic studies,*University of Lisbon, Faculty of Science, Department of Plant Biology, Centre for Environmental Biology, Bloco C2, Campo Grande, 1749–016 Lisboa, Portugal, p. 4

CHICAIZA, Omar. *Evaluación de la Alimentación de Pollos de Engorde con Subproductos de la Industria Panadera y Galletera* [En línea]. 1ra. Edición. Quito, Ecuador: Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria de la Escuela Politécnica Nacional, 2009. Disponible en <http: //biblioteca.epn.edu.ec/catalogo/fulltext/CD-2440.pdf.> pp. 53, 147. [Consulta: 24 abril 2011].

CRUZ, E, *Biodiversidad arbórea y arbustiva en las micro cuencas de los ríos Illangama y Alumbre - Provincia Bolívar, Ecuador*, INIAP Estación Experimental Santa Catalina, Quito, Ecuador, 2009, pp. 1-15.

DIXIE, G. "Guía de Extensión en comercialización de productos hortícola*",* ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, Editorial ONU, Roma, Italia, 2006, Volumen 1, pp. 40.

ESPINOZA, Y. y GUTIERREZ, R., *Variabilidad intraespecifica de Azolla filiculoides, colectadas en la zona centro-occidental de Venezuela*. [En línea]. vol.20, no.2, Venezuela: Rev. Fac. Agron., Abr. 2003, Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000200004&lng=es&nrm=iso>. [Consulta: 04 Diciembre 2011], p.156-167.

INAMHI, *Boletín Meteorológico del mes de Febrero #431* [En línea]. 1ra. Edición, Quito, Ecuador: Dirección Gestión Meteorológica, Febrero 2011, Disponible en: <http://www.inamhi.gov.ec/html/inicio.htm > [Consulta: 08 de Abril del 2011].

INAMHI, *Mapa de Irradiación Solar*, Dirección Gestión Meteorológica Quito, [en línea]. 1ra. Edición, Quito, Ecuador: Disponible en: http://www.inamhi.gov.ec/html/inicio.htm [Consulta: 08 de Abril del 2011].

MACIAS N.; MARURI J.; SÁNCHEZ F.; MONTAÑO M., "Crecimiento del *Azolla* en Las Lojas", *Artículo Revista técnica Proyecto Azolla*, Guayas, Ecuador, 2010, p. 1-2.

MANUEL, *Helechos Supervivientes Vegetales,* [En línea]. 1ra. Edición, Saber si ocupa lugar, Enero 2011, Disponible en: <http://sabersiocupalugar.blogspot.com/2010/01/helechos-supervivientes-vegetales.html> [Consulta: 08 de Abril del 2011].

MERCK, *Protocolo Test de Nitritos***,** Alemania, 2010, p. 1-10

MERCK, *Protocolo Test de Nitritos***,** Alemania, 2010, p. 1-10

MONTAÑO, Mariano, *Proyecto Azolla,* 1ra. Edición, Editorial del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales de la Escuela Superior Politécnica del Litoral ESPOL, Guayaquil, Ecuador, 2010.

LABORATORIO DE AGUAS Y SUELOS UPS, *Informe del Análisis Físico, Químico y Microbiológico*, Cayambe, 2010.

LAS ERAS, J. *Azolla caroliniana***,** [En línea]. 1ra. Edición, Paraná, Argentina: Atlas del Dr. Pez, Febrero 2011, Disponible en: www.atlasdrpez.ar/acuarioaguadulce/plantasdeaguadulceplanbtasflotantes/azolla/2010 [Consulta: 10 de febrero del 2010].

LEÓN, R, *Pastos y Forrajes Producción y manejo*, 1ra. Edición, Ed. Escuela Superior Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador, 2007, Manejo de pasturas, p. 75.

RODRÍGUEZ, C.; SEVILLANO, F.; SUBRAMANIAM P., *La fijación de nitrógeno atmosférico, una biotecnología en la producción agraria*., 1ra. Edición, Editorial del Instituto de recursos naturales y agro biología española, Salamanca, España, 1984, p.7-8.

SECKBACH, J.; y GRUBE, M., *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology 17*, Springer Science+Business Media B.V., 2010, p. 225–241

SPEER, Brian, *Introducción a las cianobacterias, Arquitectos de la atmósfera terrestre,* [En línea]: 1ra. Edición, California, EE.UU: Berkeley Univertity of California, Octubre 1995, Disponible en: http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/cyanointro.html [Consulta: 24 abril 2011]
También disponible versiones en inglés: <http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/cyanointro.html/> [Consulta: 24 Abril 2011]

UDA Universidad de Antioquia, *Seguridad en Laboratorio*, [En línea]. 1ra. Edición, Antioquia, Colombia:, Laboratorio químico, 2004, Disponible en: <http://docencia.udea.edu.co/cen/tecnicaslabquimico/03anexos/anexo02.htm> [Consulta: 11 de Abril del 2011].

UNAD-Universidad Nacional Abierta y a Distancia de Colombia, *Curso de Biología: Eubacterias* [En línea]. 1ra. Edición, Colombia: Facultad de Ciencias Básicas e

Ingeniería, 2010, Disponible en: <http://www.unad.edu.co/curso_biologia/evaluacion.htm> [Consulta: Noviembre 2010].

WUNDERGROUND, *Condiciones climatológicas para Febrero del 2011 Quito-Ecuador*, [En línea]: 1ra. Edición, Quito, Ecuador: Wunderground, Febrero del 2011, Disponible en: <http://espanol.wunderground.com/history/airport/SEQU/2011/2/1/MonthlyHistory.html > [Consulta: Mayo 2011].

11. ANEXOS.

Referencia 1. Cronograma de Ejecución: Relación Simbiótica de *Azolla-Anabaena.*

Meta	Actividad	Año 1											
		Bimestre				Bimestre				Bimestre			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Planteamiento del tema.	1. Visitas a centros de investigación, exposiciones, y azolarios.												
	2. Toma de muestras, búsqueda de bibliografía, diseño del plan.												
TRANSFERENCIA Acondicionamiento de *Azolla*, a los ecosistemas acuáticos de la zona de Cayambe.	1. Medición de variables e indicadores iniciales en los ecosistemas acuáticos.												
	2. Valoración de las variables e indicadores, que influyen en el desarrollo de *Azolla*.												
ESTABLECIMIENTO Establecer el cultivo del simbionte *Azolla.*	1. Establecimiento del cultivo de *Azolla*.												
	2. Toma de datos de variables e indicadores (c/15-días).												
	3. Valoración de las muestras												
ESTRUCTURACION DEL DOCUMENTO Planteamiento de la tesis y desarrollo.	1. Revisión de reglamentos y formatos de la UPS.												
	2. Elaboración del documento.												
	3. Proceso de defensa.												

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

Referencia 2. PRESUPUESTO: Relación Simbiótica de *Azolla-Anabaena.*

TIEMPO, % FINANCIADO		1erTrimestre (40%)		2doTrimestre (30%)		3erTrimestre (30%)		Sub Total
RUBROS	**VALORES**	**UPS**	**COFINANCIAMIENTO**	**UPS**	**COFINANCIAMIENTO**	**UPS**	**COFINANCIAMIENTO**	
1. REMUNERACIONES 1.1 Colaboradores, Estudiantes (Pre/posgrado)	(Incentivos Académicos)	x	x	x	x	x	x	x
2. ACTIVOS DEL PROYECTO 2.1 Reactivos químicos	$300,00					x		
3. SERVICIOS FUNCIONAMIENTO DEL PROYECTO								
3.1 Movilización dentro de la zona	$322,50		x					
3.2 Material biológico (20 kg.)	$400,00			x				
3.3 Materia prima para la estructura	$500,00			x				
3.4 Bomba de agua tipo pecera (2)	$225,00			x				
3.5 Conexiones de agua, válvulas, llaves check, controles de nivel de agua, acoples, codos pvc, T pvc siliconas.	$300,00			x				
3.6 Reservorios de agua 200 L. (2)	$80,00			x				
3.7 Plástico para invernadero	$80,00	x						
3.8 Sarán calibre intermedio	$45,00	x						
3.9 Bandejas plásticas	$350,00			x				
3.10 Capacitaciones dictadas a la población.	$150,00					x		
3.11 Visitas de campo fuera de la zona	$400,00	x		x				
3.12 Eventos referentes a la temática	$322,50		x					
3.13 Servicios profesionales por consultorías contratadas.	$150,00	x		x		x		
3.14 Contratación de laboratorios de la UPS.	$675,00	x				x		
4. TRANSFERENCIA DE RESULTADOS								
4.1 Divulgación científica	$200,00					x		
TOTAL DEL PERSUPUESTO	$4500,00							
% Porcentaje de cofinanciamiento	0							
COSTO TOTAL DEL PROYECTO PARA LA UPS	$4500,00							

Fuente: III CONVOCATORIA FONDOS CONCURSABLES 2010-2011
Elaborado por: El Autor.

Referencia 3. Formato de registro para toma de datos:

- **Para Agua**

a) Fijación de NO^-_2 y NO^-_3 en agua, para la especie *Azolla*. (mg./l.).

Tratamiento	**Repeticiones**	NO^-_2- **en medio acuoso (mg./L)**	**Observaciones**
$\mathbf{z_1b_1}$	1		
	2		
	3		

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

- **Para Planta**

b) Fijación de NO^-_2- en la planta, para la especie *Azolla* (%).

Especie	N_2^- **en muestra vegetal (%.)**	**Observaciones**
z_1		
z_2		
z_3		

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

- **Datos Adjuntos:**

c) Hoja de registro de datos para la variable crecimiento en las distintas especies de *Azolla* (g).

Fecha	**Especie**	**Superficie *Azolla* (cm^2)**	**Biomasa *Azolla* (g)**	**Observaciones**
	z_1			
	z_2			
	z_3			

Fuente: La investigación.
Elaborado por: El Autor.

Referencia 4. Estadística Climatológica: Ecuador, Febrero 2011

DIRECCION GESTION METEOROLOGICA

ESTUDIOS E INVESTIGACIONES METEOROLOGICAS
ESTADISTICA CLIMATOLOGICA

FEBRERO 2011

ESTACION	PRECIPITACION (mm)					TEMPERATURA (°C)				
	NORM.	MES	% VAR.	MAX. 24h. FECHA	DIAS RR.	NORM.	MES	ANOM.	MAXIMA ABSOLUTA	MINIMA ABSOLUTA
ESMERALDAS AER.	198.6	119.6	-39	40.0 / 12	10	25.9	26.6	0.7	31.5 / 12	21.6 / 8
MUISNE	623.9	NIL	NIL	0.0 / 0	NIL	26.5	NIL	NIL	30.8 / 14	23.0 / 1
LA CONCORDIA	546.0	219.2	-59	54.9 / 6	19	25.5	25.8	0.3	32.5 / 28	20.2 / 7
STO. DOMINGO AER	476.3	408.2	-14	88.0 / 9	22	23.5	23.8	0.3	30.0 / 28	19.2 / 7
PUERTO ILA	520.5	316.2	-39	77.6 / 9	25	25.3	25.5	0.2	32.0 / 28	20.5 / 8
CHONE	335.2	NIL	NIL	NIL	NIL	26.8	26.5	-0.3	33.0 / 21	21.2 / 18
PORTOVIEJO	139.9	121.8	-12	27.9 / 18	15	26.9	26.6	-0.3	33.6 / 27	18.7 / 27
PICHILINGUE	446.5	490.5	9	114.1 / 16	20	26.3	26.3	0.0	33.2 / 28	20.9 / 7
BABAHOYO	550.9	NIL	NIL	NIL	NIL	26.8	NIL	NIL	33.7 / 27	22.5 / 24
MILAGRO	386.8	267.2	-30	87.8 / 6	18	26.3	26.8	0.5	33.3 / 28	21.0 / 4
GUAYAQUIL AER.	297.6	170.7	-42	38.0 / 6	18	27.3	27.0	-0.3	33.1 / 27	21.7 / 24
SANTA ROSA	138.6	171.9	24	93.0 / 13	9	25.9	26.9	1.0	32.5 / 25	21.9 / 8
ZARUMA	291.2	184.6	-36	48.7 / 7	22	22.0	23.2	1.2	33.4 / 25	14.5 / 3
TULCAN AER.	83.7	106.0	26	18.0 / 20	21	12.0	12.5	0.5	20.0 / 5	3.2 / 26
EL ANGEL	105.2	39.4	-62	7.0 / 7	19	12.0	11.2	-0.8	29.2 / 4	3.4 / 8
SAN GABRIEL	78.4	136.1	73	32.1 / 23	22	12.4	12.1	-0.3	21.2 / 5	3.0 / 26
INGUINCHO	120.1	207.0	72	20.6 / 16	24	10.6	10.1	-0.5	15.5 / 18	5.4 / 25
IBARRA AER.	58.0	87.1	50	20.0 / 28	18	16.2	17.0	0.8	24.5 / 25	9.6 / 27
OTAVALO	86.4	109.0	26	17.2 / 22	17	14.5	14.8	0.3	24.0 / 5	4.4 / 26
TOMALON	65.8	108.5	64	15.6 / 17	19	15.1	15.3	0.2	24.0 / 26	6.4 / 26
QUITO-IÑAQUITO	117.1	182.8	56	23.9 / 24	22	15.3	15.3	0.0	23.0 / 1	7.6 / 26
LA TOLA	78.2	149.1	90	41.3 / 22	16	16.5	15.7	-0.8	25.8 / 3	5.6 / 26
IZOBAMBA	154.7	206.0	33	42.4 / 6	22	12.1	12.1	0.0	19.6 / 4	3.8 / 26
LATACUNGA AER.	57.9	105.8	82	21.0 / 16	16	14.4	15.2	0.8	24.6 / 24	4.5 / 26
EL CORAZON	617.6	471.3	-23	65.6 / 17	28	18.1	17.8	-0.3	22.5 / 25	14.5 / 7
RUMIPAMBA	57.4	129.4 (R)	125	21.2 / 14	16	15.3	15.4	0.1	24.0 / 12	6.1 / 26
AMBATO AER.	50.8	108.6	113	27.0 / 28	15	15.5	16.5	1.0	25.5 / 18	8.9 / 5
QUEROCHACA	46.6	71.6	53	20.9 / 16	17	13.4	14.4	1.0	23.0 / 5	4.8 / 5
RIOBAMBA AER.	51.8	134.7	160	48.0 / 14	15	14.7	15.5	0.8	25.6 / 5	5.5 / 26
CAÑAR	56.8	97.3	71	20.8 / 23	20	12.2	11.5	-0.7	19.0 / 22	5.0 / 5
CUENCA AER.	91.3	132.0	44	26.0 / 7	15	16.3	16.9	0.6	24.5 / 4	8.3 / 19
PAUTE	74.2	36.2	-51	8.9 / 11	14	17.8	18.9	1.1	28.0 / 18	10.3 / 21
GUALACEO	75.2	38.4	-48	7.5 / 10	12	18.2	17.5	-0.7	27.0 / 5	7.8 / 10
SARAGURO	113.5	83.6	-26	18.5 / 11	12	13.0	15.3	2.3	23.5 / 23	7.0 / 23
LA ARGELIA	128.5	205.3	59	28.6 / 7	21	16.5	17.2	0.7	25.8 / 5	10.2 / 19
LA TOMA AER.	63.2	93.7	48	19.0 / 15	14	23.9	24.1	0.2	34.7 / 23	16.6 / 23
CELICA	308.0	181.0	-41	74.0 / 6	12	15.9	16.7	0.8	29.8 / 8 (R)	11.6 / 17
CARIAMANGA	253.4	145.5	-42	37.6 / 12	11	17.5	18.7	1.2	26.5 / 3	11.6 / 19
LAGO AGRIO AER.	170.5	315.8	85	116.6 / 20	20	26.4	26.2	-0.2	33.4 / 18	21.0 / 5
EL COCA AER.	NIL	227.7	NIL	83.0 / 24	17	27.1	27.2	0.1	35.1 / 18	20.9 / 23
NVO. ROCAFUERTE	182.8	124.8	-31	49.8 / 8	10	26.7	27.4	0.7	34.5 / 18	20.9 / 7
TENA AER.	203.6	256.3	25	43.0 / 24	17	24.9	24.8	-0.1	32.1 / 18	18.5 / 26
PASTAZA AER.	345.4	310.5	-10	87.0 / 13	22	21.6	21.3	-0.3	28.0 / 27	16.4 / 26
PUYO	315.9	437.3	38	134.7 / 20	25	21.6	22.2	0.6	29.2 / 15	16.0 / 13
MACAS AER.	175.8	169.7	-3	39.0 / 27	19	22.3	22.2	-0.1	29.6 / 16	16.4 / 26
S. CRISTOBAL-GAL.	96.7	199.1	105	65.3 / 20	16	26.6	26.6	0.0	31.4 / 4	20.8 / 26

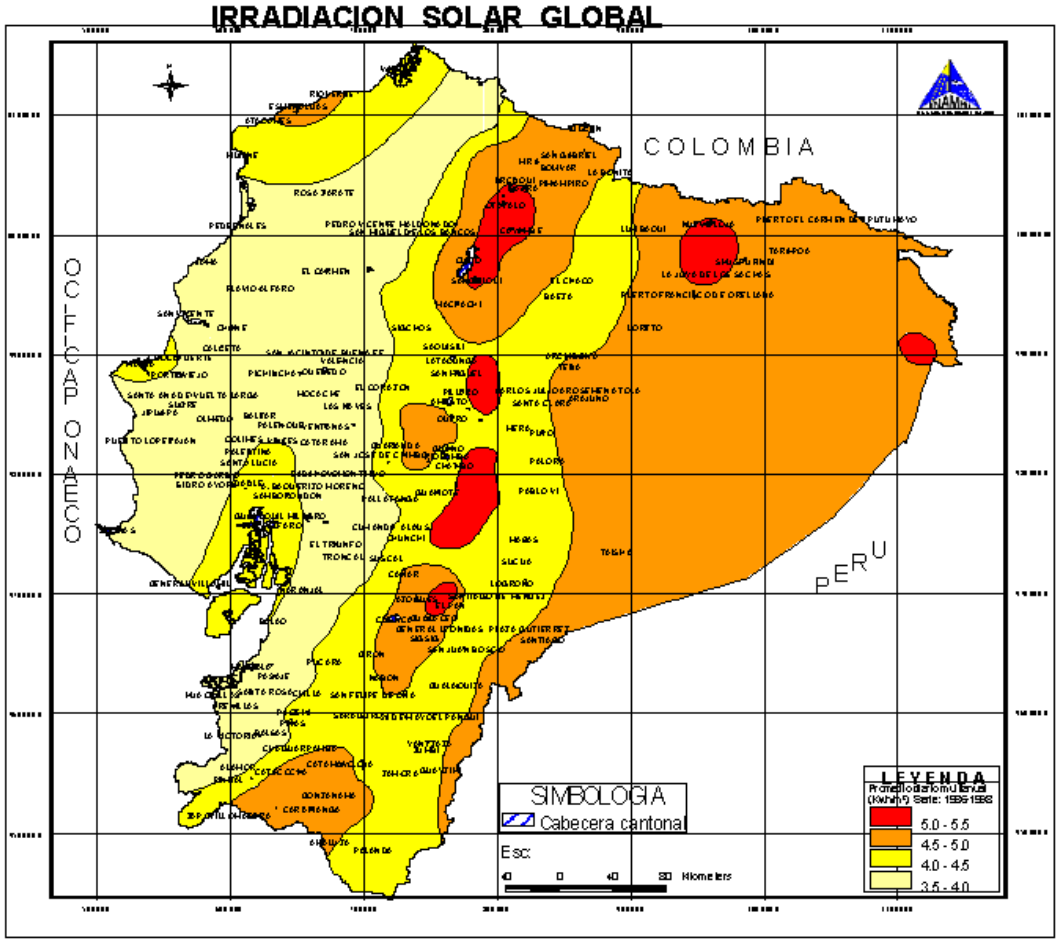
NIL = No reporta información
(R) = Record Máximo de serie
(r) = Record Mínimo de serie
NOTA: Los datos utilizados están sujetos a verificación
La temperatura media y mensual son calculadas en base a temperaturas extremas

Fuente: Dirección Gestión Meteorológica-INIAP, 2011.
Elaborado por: Dirección Gestión Meteorológica-INIAP, 2011.

Referencia 5. Condiciones Climatológicas para Noviembre del 2010.

RESUMEN DE LAS CONDICIONES CLIMATOLÓGICAS / FEBRERO 2011	Max	Avg	Min	Sum.
Temperatura				
Temperatura máxima	**22** ° C	**19** ° C	**15** ° C	
Temperatura media	**18** ° C	**14** ° C	**13** ° C	
Temperatura mínima	**14** ° C	**11** ° C	**6** ° C	
Degree Days				
Grados día de calefacción (base 65)	10	7	1	202
Cooling Degree Days (base 65)	0	0	0	0
Growing Degree Days (base 50)	14	8	5	222
Punto de rocío				
Punto de rocío	**14** ° C	**11** ° C	**2** ° C	
Precipitación				
Precipitación	**0.0** cm	**0.0** cm	**0.0** cm	**0.00** cm
Snowdepth	-	-	-	-
Viento				
Viento	**39** km/h	**5** km/h	**0** km/h	
Gust Viento	**50** km/h	**40** km/h	**32** km/h	
Presión al nivel del mar				
Presión al nivel del mar	**1031** hPa	**1026** hPa	**1020** hPa	

Fuente: WUNDERGROUND, 2010,
Elaborado por: WUNDERGROUND, 2010.



Fuente: INAMHI, 2011.
Elaborado por: Dirección Gestión Meteorológica

A) Visita técnica realizada a sitios representativos con motivo de adquirir transferencia de tecnología y material bibliográfico y vegetal:
-ESPOL-Guayaquil

Imagen 12. Visita y recolección de muestras al Azolario de la ESPOL ubicado en el cantón San Borondón-Guayas

Imagen 11. Distintivo que representa el trabajo que lleva a cabo la ESPOL con el financiamiento del Banco Mundial.

Imagen 13. Visita al proyecto Azolla Abono Verde /Guayaquil

Imagen 14. Forma en la que se deben recolectar las muestras desde el plantel-vivero.

Imagen 15. Procedimiento para conservar las muestras durante el viaje de regreso de 10 horas a Cayambe

Imagen 16. Uso de papel periódico húmedo, con motivo de conservar la humedad de la muestra vegetal recolectada

B) Visita técnica realizada a los diferentes sitios representativos de nuestra zona de influencia con motivo de recolectar material vegetal endémico: -Cayambe, Paquiestancia, Tabacundo, Pesillo, Santa Clara, La Chimba, Cangahua, San Pablo del Lago.

Imagen 19. Localización de Muestras en la laguna de San Pablo

Imagen 18. Localización de Muestras en el sector de rural cercano a Cayambe

Imagen 17. Localización de Muestras en la comunidad de Paquiestancia.

Imagen 21. Comparación óptica de tamaños

Imagen 20. Comparación óptica de los diferentes sitios de recolección dentro de la zona de influencia de Cayambe

C) Adaptación de las muestras 3 muestras específicas al entorno donde se instalará el experimento.
-Santa Rosa de la Compañía Adaptación de las muestras 3 muestras específicas al entorno donde se instalará el experimento.

Imagen 22. Proceso de adaptación y reproducción del material vegetal madre.

Imagen 23. Finalmente se concluyó que el uso de envases transparentes permite de mejor manera el paso de luminosidad, contribuyendo al desarrollo del simbionte.

Imagen 24. Uso de diferentes técnicas y envases para la reproducción vegetal.

D) Trabajo de Campo y experimentación previa.
-Santa Rosa de la Compañía-Ayora-Cayambe.

Imagen 26. Control de desarrollo de las tres especies de Azolla recolectadas en la zona.

Imagen 25. Análisis de condiciones previas a la instalación del experimento en campo

E) Uso de equipo específico para la toma de datos:
-Termómetro
-medidor de humedad
-Santa Rosa de la Compañía-Ayora-Cayambe

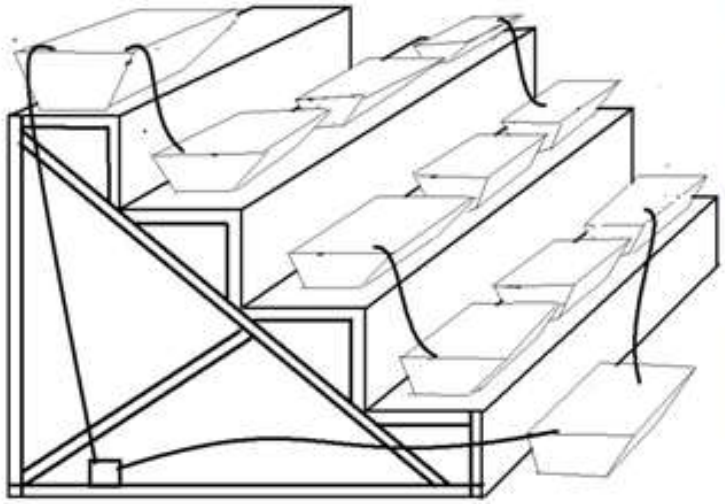


Imagen 28. Prueba de primer Bosquejo del diseño a implementar desde la teoría a la práctica.

Imagen 27. Instrumentos de medición de temperatura máxima, mínima y humedad.

F) Análisis específicos de laboratorio, muestras iniciales para estandarización de procedimiento.
-Laboratorios de la UPS-Cayambe.

Imagen 30. Adición de reactivo a la muestra de agua tomada en el sitio de desarrollo del material vegetal.

Imagen 29. Análisis de la reacción a partir de la adición de reactivo a la muestra, con motivo de cuantificar la existencia de nitrógeno en el agua.

Imagen 31. Pipeteo para el análisis de una nueva muestra de