UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

CONSERVACIÓN *in vitro* Y CULTIVO DE CYANOPROKARIOTAS BENTÓNICAS ARRECIFALES DE PROVIDENCIA Y SANTA CATALINA ISLAS, COLOMBIA

John Edward Cano Arango

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2018

CONSERVACIÓN *in vitro* Y CULTIVO DE CYANOPROKARIOTAS BENTÓNICAS ARRECIFALES DE PROVIDENCIA Y SANTA CATALINA ISLAS, COLOMBIA

John Edward Cano Arango

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biología

Director:

Dr. Luis Carlos Montenegro Ruíz

Línea de Investigación:

Laboratorio de Cultivo de Algas

Grupo de Investigación:

Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2018

La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa!

Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo.

Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa

hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.

Marie Curie

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por formarme como profesional.

A Colciencias por la financiación del proyecto de investigación.

A la Facultad de Ciencias por las becas otorgadas y el apoyo económico para realizar la pasantía.

A mi amigo y director de tesis Luis Carlos Montenegro por su apoyo incondicional, paciencia y acompañamiento en este camino.

A todos los integrantes de grupo del CIIMAR, por sus asesorías y enseñanzas. Especialmente al profesor Vitor Vasconcelos por su acogida en Portugal durante mi pasantía.

A mis compañeros del grupo de investigación Mario, Jefferson, Alejandra y Hugo por toda su colaboración y apoyo.

A mis padres, hermanos y familia por su apoyo incondicional; especialmente a mi hermoso hijo Nicolás por darme la fuerza y ser ese motor que me impulsa a seguir adelante en esta linda carrera.

A mis amigos de toda la vida Ricardo y Rubén por estar siempre ahí cuando los necesite.

Y a todas las personas que me acompañaron de alguna forma en el proceso.

¡Muchas gracias!

Resumen

Colombia cuenta con el 44,86% de su extensión como territorio marino, ecosistemas con organismos de gran interés para la bioprospección como las cianobacterias. Que son una fuente de productos naturales estructuralmente diversos con amplias actividades biológicas. Este trabajo de investigación pretende de manera general cultivar cyanoprokariotes bentónicas arrecifales de Providencia y Santa Catalina Islas – Colombia en condiciones de laboratorio para su conservación in vitro y producción de biomasa. Para dar cumplimiento a este objetivo el aislamiento se realizó por técnicas de rayado en agar y repiques continuos en medio nutritivo líquido BG11; obteniendo 25 cepas. Se realizaron pruebas de conservación *in vitro* en medios solidos nutritivos BG11 medium, C medium, ASNIII medium, Z8 medium, SN medium, F/2 medium y ES medium, suplementados con sal marina (25 g / l). durante 50 días, con una intensidad de luz de 16,2 µmol m^{-2} s^{-1}, fotoperiodo 12:12 luz /oscuridad y una temperatura promedio de 23 °C. Se hicieron cinco replicas por cepa. Se evaluó el crecimiento de acuerdo con el área de colonización e intensidad de color en cada cultivo, mediante programa ImageJ (software de libre acceso). Teniendo como resultados que en el medio nutritivo ASNIII muestran mayor crecimiento los organismos de estudio. Se evaluó el efecto de la irradiancia y fotoperiodo en la producción de biomasa, clorofila a, carotenos, ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina, proteínas, carbohidratos y lípidos en *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp. 3 y *Stanieria* sp. sometidos en cultivos discontinuos de 250 ml a intensidades de luz de 18,5; 55,5 y 111 µmol*m^{-2}*s^{-1} y horas de exposición a la luz de 12, 14 y 16. Cada tratamiento con 6 réplicas. Encontrando que cada cepa tiene condiciones óptimas diferentes para la acumulación de biomasa, pigmentos fotosintéticos y contenido bioquímico. Se hizo un test de toxinas para microcistinas y nodularinas por ELISA y la cepa 7 dio positivo con una concentración de 0,3 µg / l. Finalmente, se realizó un estudio preliminar de bioactividad a extractos crudos de 18 cepas sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y cinco líneas celulares de cáncer. Los resultados arrojaron que tan solo la cepa 3 tiene inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y 11 cepas en bacterias Gram negativas. Todos

los extractos crudos mostraron reducir la viabilidad de la célula de cáncer en diferentes porcentajes.

Palabras clave: Cianobacteria, bioactividad, metabolitos secundarios, Caribe, composición bioquímica.

Abstract

Colombia has 44.86% of its extension as a marine territory, ecosystems with organisms of great interest for bioprospecting such as cyanobacteria. They are a source of structurally diverse natural products with extensive biological activities. This research work aims in general to cultivate reef benthic cyanoprokariotes from Providencia and Santa Catalina Islas - Colombia under laboratory conditions for in vitro conservation and biomass production. In order to comply with this objective, the isolation was carried out by means of agar streaking and continuous pealing in liquid nutrient medium BG11; obtaining 25 strains. In vitro conservation tests were performed on nutritious solid media BG11 medium, C medium, ASNIII medium, Z8 medium, SN medium, F / 2 medium and ES medium, supplemented with sea salt (25 g / l). for 50 days, with a light intensity of 16.2 µmol m-2 s-1, photoperiod 12:12 light / dark and an average temperature of 23 ° C. Five replicates were made per strain. Growth was evaluated according to the area of colonization and intensity of color in each culture, by means of the ImageJ program (free access software). Taking as results that in the nutrient medium ASNIII the study organisms show higher growth. The effect of irradiance and photoperiod in the production of biomass, chlorophyll a, carotenes, phycocyanin, allophycocyanin, phycoerythrin, proteins, carbohydrates and lipids in *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp. 3 and *Stanieria* sp. submitted in discontinuous cultures of 250 ml at light intensities of 18.5; 55.5 and 111 µmol * m-2 * s-1 and hours of light exposure of 12, 14 and 16. Each treatment with 6 replicas. Finding that each strain has different optimal conditions for the accumulation of biomass, photosynthetic pigments and biochemical content. A toxin test was made for microcystins and nodularins by ELISA and strain 7 was positive with a concentration of 0.3 µg / l. Finally, a preliminary bioactivity study was carried out on crude extracts of 18 strains on Gram positive bacteria, Gram negative bacteria, fungi and five cancer cell lines. The results showed that only strain 3 inhibits the growth of Gram positive bacteria and 11 strains in Gram negative bacteria. All the crude extracts showed to reduce the viability of the cancer Cell in different percentages.

Keywords: Cyanobacteria, bioactivity, secondary metabolites, Caribbean, biochemical composition.

Contenido

1. Introducción 2

2. Cyanoprokariotas marinas del neotrópico y sus metabolitos secundarios con potencial de bioactividad: Caso de estudio Colombia 5
2.1 Resumen 5
2.2 Introducción 6
2.3 Metabolitos secundarios 7
2.4 Cyanoprokariotas en Colombia 10
2.5 Conclusiones 13
2.6 Bibliografía 13

3. Aislamiento, identificación y conservación *in vitro* de cyanoprokariotas bentonicas arrecifales de Providencia y Santa Catalina Islas 23
3.1 Resumen 23
3.2 Introducción 25
3.3 Materiales y métodos 26
3.3.1 Lugar de muestro 26
3.3.2 Aislamiento 28
3.3.3 Identificación taxonómica 29
3.3.4 Conservación *in vitro* 30
3.4 Resultados 32
3.4.1 Identificación taxonómica 32
3.4.2 Cinética de crecimiento 42
3.4.3 Índice de crecimiento 45
3.5 Discusión 45
3.6 Conclusiones 49
3.7 Bibliografía 50

4. Producción de biomasa y pigmentos de los cyanoprokariotes marinos *Synechococcus* sp. (Synechococcales), *Stanieria* sp. (Pleurocapsales) y *Leptolyngbya* sp. (Synechococcales) en función de la irradiancia. 55
4.1 Resumen 55
4.2 Introducción 57
4.3 Materiales y métodos 58
4.3.1 Condiciones de cultivo 58
4.3.2 Peso seco 59
4.3.3 Extracción de clorofilas y carotenos 60
4.3.4 Extracción de ficobiliproteínas 60
4.3.5 Análisis estadístico 60
4.4 Resultados 61
4.4.1 *Synechococcus* sp. 61
4.4.2 *Stanieria* sp 63
4.4.3 *Leptolyngbya* sp. 3 66
4.5 Discusión 67
4.6 Conclusiones 70
4.7 Bibliografía 71

5. Composición bioquímica y evaluación de metabolitos secundarios de los cyanoprokariotes marinos *Synechococcus* sp. (Synechococcales), *Stanieria* sp. (Pleurocapsales) y *Leptolyngbya* sp. (Synechococcales) 77
5.1 Resumen 77
Abstract 78
5.2 Introducción 79
5.3 Materiales y métodos 80
5.3.1 Cuantificación de proteínas 81
5.3.2 Cuantificación de carbohidratos 81
5.3.3 Cuantificación de lípidos 81
5.3.4 Detección y cuantificación de microcistinas y nodularinas 82
5.3.5 Extractos para pruebas de bioactividad 82
5.3.6 Ensayos antimicrobianos y antifúngicos 82
5.3.7 Bioactividad en líneas celulares de cáncer 83
5.4 Resultados 84
5.5 Discusión 92
5.6 Conclusiones 95
5.7 Bibliografía 96

6. Conclusiones y recomendaciones 103
6.1 Conclusiones 103
6.2 Recomendaciones 104

7. ANEXOS 105
7.1 ANEXO A 105
7.2 ANEXO B 108
7.3 ANEXO C 122

Lista de figuras

Figura 1. Estaciones de muestreo en las Islas de Providencia y Santa Catalina. (A) Felipe´s Place. (B) Costado suroriental de la isla de Santa Catalina. Tomado y modificado de Google Earth ©

Figura 2. Aislamiento por estriado en placas

Figura 3. Aislamiento por repique continuo en medio nutritivo líquido

Figura 4. *Leptolyngbya* sp 1 con tinción de azul de metileno. A. Tamaño de células del tricoma. B. Hormogonio. C. Presencia vaina.

Figura 5. *Leptolyngbya* sp 2 con tinción de azul de metileno.

Figura 6. *Stanieria* sp. A. Formación de baeocitos. B. Organismo con tinción de azul de Metileno.

Figura 7. A y B, *Synechococcus* sp

Figura 8. Curva de crecimiento de *Synechococcus* sp.

Figura 9. Curva de crecimiento de *Stanieria* sp

Figura 10. Curva de crecimiento de *Leptolyngbya* sp 1.

Figura 11. Curva de crecimiento de *Leptolyngbya* sp 2.

Figura 12. Curva de crecimiento de *Leptolyngbya* sp 3.

Figura 13. Índice de evaluación de crecimiento.

Figura 14. Producción de biomasa en cultivo de 15 días de *Synechococcus* sp.

Figura 15. Concentración de clorofilas y carotenos en *Synechococcus* sp.

Figura 16. Concentración de ficobiliproteínas en *Synechococcus* sp.

Figura 17. Producción de biomasa en cultivo de 30 días de *Stanieria* sp.

Figura 18. Concentración de clorofilas y carotenos en *Stanieria* sp.

Figura 19. Concentración de ficobiliproteínas en *Stanieria* sp.

Figura 20. Producción de biomasa en cultivo de 15 días de *Leptolyngbya* sp. 3.

Figura 21. Concentración de clorofilas y carotenos en *Leptolyngbya* sp 3.

Figura 22. Concentración de ficobiliproteínas en *Leptolyngbya* sp. 3.

Figura 23. Reacción de MTT con la enzima succionaldeshidrogenasa. (Tomado de: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html)
Figura 24. Composición bioquímica de *Synechococcus* sp.
Figura 25. Composición bioquímica de *Stanieria* sp.
Figura 26. Composición bioquímica de *Leptolyngbya* sp. 3.
Figura 27. Prueba de citotoxicidad en línea celular SH-SY5Y.
Figura 28. Prueba de citotoxicidad en línea celular T47D.
Figura 29. Prueba de citotoxicidad en línea celular Hep62.
Figura 30. Prueba de citotoxicidad en línea celular RKO.
Figura 31. Prueba de citotoxicidad en línea celular HDMC.

Lista de tablas

Tabla 1. Productos naturales de cianobacterias marinas del trópico. (*Organismos con problemas de identificación taxonómica. **Reportes para Colombia)

Tabla 2. Cianobacterias marinas reportadas para Colombia

Tabla 3. Composición química de medios nutritivos enriquecidos con sal marina

Tabla 4. Secuencias de cepas aisladas y su identidad

Tabla 5. Numero de tratamientos según combinatoria de variables.

Tabla 6. Redimiendo de extractos con relación a la biomasa.

Tabla 7. Bioactividad de extractos crudos de cyanoprokariotes en cepas bacterianas. + positivo (inhibición de crecimiento bacteriano) – negativo (no presenta inhibición de crecimiento bacteriano).

1. Introducción

Los cyanoprokariotes comúnmente conocidas como cianobacterias son organismos fotosintéticos que tienen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica (Fundación Nacional de Saúde 2003). Además, se les atribuye un papel importante en la fijación de nitrógeno, la presencia de una atmosfera oxigénica (Merel *et al*. 2013), de ser las precursoras de la capa de ozono (Mur *et al*. 1999) y dar origen a las plantas superiores y los cloroplastos a través de mecanismos de endosimbiosis (Kutschera 2005).

Las cianobacterias poseen una gran variedad morfológica, estructural y fisiológica, lo cual las hacen organismos que se adaptan a una amplia gama de parámetros ambientales, destacando los ambientes extremos (Whitton & Potts 2000). Además, estos organismos producen una gran variedad de metabolitos secundarios utilizados en pruebas clínicas (por ejemplo; para tratar enfermedades como el cáncer), la industria farmacéutica, compuestos bactericidas, fungicidas e insecticidas. El conocimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas en cultivos de laboratorio, en un amplio rango de parámetros puede ayudar no sólo a determinar su potencial biotecnológico, sino también a determinar e interpretar de manera más eficiente los resultados adquiridos del crecimiento de estos microorganismos en su ambiente natural. (Fuenmayor et al. 2009). Siendo como tarea fundamental realizar estudios para encontrar nuevos compuestos para tratar los retos de la agroindustria y la salud pública, e implementar técnicas de cultivo y procesos de escalamiento para la producción continua de biomasa.

Esta investigación buscó cultivar cianobacterias bentónicas arrecifales de Providencia y Santa Catalina Islas en condiciones de laboratorio para su conservación *in vitro* y producción de biomasa, a través de los siguientes objetivos estandarizar un protocolo para el aislamiento y conservación in vitro de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe

colombiano, evaluar diferentes condiciones de cultivo para la producción de biomasa de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano a nivel de laboratorio, y caracterizar aspectos bioquímicos de la biomasa producida a nivel de laboratorio de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano. Cada objetivo se desarrolla en formato de artículo en el presente documento. Adicionalmente se presenta los resultados de la investigación en metabolitos secundarios desarrollada como pasantía en el CIIMAR de Portugal.

La presente tesis hace parte del proyecto “Cultivo de cianobacterias y actinobacterias marinas: una nueva aproximación para el control de insectos y fitopatógenos”, financiado por Colciencias.

2. Cyanoprokariotas marinas del neotrópico y sus metabolitos secundarios con potencial de bioactividad: Caso de estudio Colombia

2.1 Resumen

Las cianobacterias marinas del trópico son una fuente significativa de productos naturales estructuralmente diversos con amplias actividades biológicas. En la última década a nivel mundial se ha aumentado en gran medida el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial bioactivo. Colombia un país que cuenta con el Mar Caribe y el Océano Pacifico, presenta escasos estudios en el tema siendo el primero reportado para el 2011. En la presente revisión se muestra las especies de cianobacterias reportadas para Colombia y una visión general de los compuestos bioactivos producidos por cianobacterias marinas.

Palabras claves: cianobacteria, Caribe, Colombia, metabolitos secundarios.

Abstract

The marine cyanobacteria of the tropics are a significant source of structurally diverse natural products with extensive biological activities. In the last decade worldwide, the discovery of new compounds with bioactive potential has been greatly increased. Colombia, a country that has the Caribbean Sea and the Pacific Ocean, presents few studies on the subject being the first reported for 2011. This review shows the species of cyanobacteria reported for Colombia and an overview of the bioactive compounds produced by marine cyanobacteria.

Key words: cyanobacteria, Caribbean, Colombia, secondary metabolites.

2.2 Introducción

Los cyanoprokariotes, también conocidos como Cianobacterias son organismos que poseen una gran variedad morfológica, estructural y fisiológica; se adaptan a una amplia gama de parámetros ambientales, destacando los ambientes extremos (Whitton & Potts 2000). Además, realizan fotosíntesis oxigénica (Fundación Nacional de Saúde 2003), tienen un papel importante en la fijación de nitrógeno (Merel *et al.* 2013), se sugieren como los precursores de la capa de ozono (Mur *et al*. 1999) y dieron origen a las plantas superiores y cloroplastos a través de mecanismos de endosimbiosis (Kutschera 2005). Otras de sus características es la producción de metabolitos secundarios con gran diversidad estructural, siendo el centro de investigación para la búsqueda de compuesto bioactivos (Shih *et al*. 2012; Tidgewell *et al*. 2010).

Los metabolitos secundarios de las cianobacterias tienen funciones: alelopáticas, protección de radiación UV, evitar la herbivoría e inhibir el quórum sensing (Puglisi *et al*. 2014) entre otros. Muchos de estos compuestos tienen propiedades antialgales, antibacterianas, antifúngicas, antivirales e inmunomoduladores (Thajuddin & Subramanian, 2005). En la última década las investigaciones de cianobacterias marinas han llevado al descubrimiento de más de 400 nuevos compuestos naturales principalmente péptidos no ribosomales, policétidos y productos mixtos de policétidos-péptidos no ribosomales. En 2016 se aislaron un total de 126 nuevos compuestos, principalmente de los géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Symploca* (Mi *et al*. 2017). Teniendo en cuenta, que del género *Lyngbya* salieron dos nuevos géneros *Moorea* y *Okeania* (Engene *et al*. 2012; Engene *et al*. 2013) y del género *Symploca*, un nuevo género *Caldora* (Engene *et al*. 2013).

Colombia, de su territorio nacional tiene aproximadamente el 44,86% de espacio marítimo (Prato & Newball 2015), ambiente que ha sido subvalorado en cuanto a su diversidad microbiana, ya que para el tema de cianobacterias encontramos contados trabajos como el inventario de Díaz & Díaz en el 2003 y Reyes *et al*. en 2013 para el caribe colombiano; y Murillo & Peña en 2013 para la zona del pacifico.

Debido a lo anterior, y teniendo en cuenta la importancia que han tomado las cianobacterias a nivel mundial, por su producción de compuestos bioactivos, esta revisión

tiene como objetivo difundir el estado del estudio de cianobacterias en Colombia en el ámbito investigativo

2.3 Metabolitos secundarios

Las cianobacterias marinas son una de las fuentes más prometedoras de compuestos bioactivos, ya que alrededor del 24% de los productos naturales marinos comercializados son producidos por estos organismos (Bayona 2014). De acuerdo con la literatura del orden Oscillatoriales han sido aislados cerca del 58 % de los metabolitos secundarios reportados, destacando al género *Lyngbya*, el cual ha mostrado una mayor capacidad metabólica y por tanto una gran diversidad de compuestos (ver tabla 1) (Prato 2013). Del género *Lyngbya* se han sido aislados 260 compuestos, de los cuales hasta el 2009, 185 fueron reportados para la especie *Lyngbya majuscula* (Soria *et al*. 2009). Sin embargo, Engene *et al*. (2013) demuestra que este género es un grupo polifilético, porque los caracteres morfológicos y morfométricos utilizados tradicionalmente para la clasificación de cianobacterias se hacen insuficientes.

En la tabla 1 se observa como en la última década se ha incrementado el descubrimiento de moléculas con bioactividad en cianobacterias del trópico y los correspondientes organismos de las cuales han sido aislados.

Especie	**Compuesto**	**Referencia Bibliográfica**
Anabaena torulosa	Laxaphycin B*	Bornancin *et al.* 2015
Blennothrix cantharidosmum	Tumonoic acids D al I	Clark *et al.* 2008
Oscillatoria margaritifera	Ethyltumonoate A	Engene *et al.* 2011
	Veraguamides A al C and H al L	Mevers *et al.* 2011
Oscillatoria sp.	Coibacins A al D	Balunas *et al.* 2012
	Propenediester*	Gutierrez *et al.* 2011
	Serinolamide A*	Gutierrez *et al.* 2011
	Venturamides A al B	Linington *et al.* 2007
	Palmyrrolinone*	Pereira *et al.* 2011
	Thiopalmyrone*	Pereira *et al.* 2011
Schizothrix sp.	Gallinamide A	Linington *et al*. 2009; Conroy *et al*. 2011
Symploca sp.	Janthielamide A*	Nunnery *et al.* 2012
	Carmaphycins A y B	Pereira *et al.* 2012
	Kimbeamides A al C*	Nunnery *et al.* 2012

	Hoiamides C y D	Choi et al. 2010; Wang et al. 2011; Malloy et al. 2012
	Kimbelactone A*	Nunnery *et al.* 2012
	Largazole	Engene *et al.* 2013
	Tasiamides C al E	Mevers *et al*. 2014
Trichodesmium sp.	Credneramides A y B	Malloy *et al.* 2012
	Credneric acid	Malloy *et al.* 2012
Leptolyngbya crossbyana	Crossbyanols A al D	Choi *et al.* 2010
	Honaucins A al C	Choi *et al.* 2012
Leptolyngbya sp.	Coibamide A	Medina *et al.* 2008
	Palmyrolide A	Pereira *et al.* 2010
*Moorea bouillonii (*Anteriormente *Lyngbya bouillonii)*	Apratoxins F y G	Tidgewell *et al.* 2010
	Cyanolide A	Pereira *et al.* 2010
	Bouillonamide	Tan *et al.* 2013
	Mooreamide A	Mevers *et al.* 2014
	Lyngbyabellins A al C	Thacker & Paul 2004
	Lyngbyabellin K al N	Choi *et al.* 2012
	Lyngbyapeptins D	Thacker & Paul 2004
	Palau'imide	Thacker & Paul 2004
Okeania sp.	Kurahyne B	Okamoto *et al.* 2015
Caldora penicillata	Caldoramide	Gunasekera *et al.* 2016
Okeania lorea (Anteriormente *Lyngbya confervoides)*	Grassypeptolides A al C	Engene *et al.* 2013
	Grassystatins A al C	Engene *et al.* 2013; Mi *et al.* 2017;
Lyngbya majuscula	Almiramides A al C**	Sanchez *et al*. 2010; Quintana *et al*. 2014
	Apratoxins A to C	Grindberg *et al.* 2011
	Barbamide	Engene *et al.* 2013
	Curacins A al C	Engene *et al.* 2011
	Curacin D	Engene *et al.* 2013
	Curazole	Engene *et al.* 2011
	Dragonamides E	Balunas et al. 2010
	Dechlorobarbamide	Engene *et al.* 2011
	Hectochlorin	Marquez *et al.* 2002
	Jamaicamides A al C	Edwards *et al.* 2004
	Palmyramide A	Taniguchi *et al.* 2010
	(--)-*trans*-7S-Methoxy tetradocenoic acid	Engene *et al.* 2013
	Dolastatin 12	Engene *et al.* 2013
	Lyngbyastatins 1, 3	Clark *et al.* 2008
	Lyngbyatoxin A	Thacker & Paul 2004
	Majusculamides A y B	Thacker & Paul 2004

	Malyngamides A y B	Thacker & Paul 2004
	Malyngamide C	Engene *et al.* 2013
	Malyngamide C acetate	Engene *et al.* 2013
	Methyltumonoates A y B	Engene *et al.* 2013
	Microcolins A y B	Engene *et al.* 2013
	Pitipeptolides A y F	Thacker & Paul 2004
	Pitiprolamide	Thacker & Paul 2004
	Tumonoic acids A al C	Engene *et al.* 2013
	Lyngbyoic acid	Engene *et al.* 2013
	Malyngolide	Engene *et al.* 2013
	Indanone	Thacker & Paul 2004
Moorea producens (Anteriormente *Lyngbya polychroa)*	ebowmide	Engene *et al.* 2013
	Carmabin A	McPhail *et al.* 2007
	Dragomabin	McPhail *et al.* 2007
	Dragonamides A y B	McPhail *et al.* 2007
	Dragonamides C y D	Engene *et al.* 2013
Lyngbya semiplena	Pitiamide A	Thacker & Paul 2004
Lyngbya sordida	Apratoxin D	Gutierrez *et al.* 2008
Lyngbya sp.	Maedamide	Iwasaki *et al*. 2014; Takayanagi *et al.* 2015
	Jahanyne	Iwasaki *et al.* 2015
	Bisebromoamide	Teruya *et al.* 2009
	Norbisebromoamide	Sasaki *et al.* 2011
	Ulongamides A y F	Thacker & Paul 2004
Oscillatoria nigroviridis	Almiramide D**	Quintana et al. 2014
	Almiramide E y H**	Quintana et al. 2014
Okeania comitata (Anteriormente *Oscillator nigroviridis)*	Viridamides A y B*	Simmons *et al.* 2008
Phormidium gracile	Hoiamides A y C	Choi *et al.* 2010
Phormidium sp.	Phormidolide	Williamson *et al.* 2002
Symploca hydnoides	Dolastatin 10	Engene *et al.* 2013
	Symplostatin 1	Thacker & Paul 2004
Synechococcus sp.	Synechobactins A al C	Yusai & Butler 2005
Trichodesmium erythraeum	Trichamide	Sudek *et al.* 2006

Tabla 1. Productos naturales de cianobacterias marinas del trópico. (*Organismos con problemas de identificación taxonómica. **Reportes para Colombia)

La mayoría de metabolitos secundarios de las cianobacterias son compuestos derivados de la policétido sintetasa (PKS) [Primer: DKF/DKR GTGCCGGTNCC(A/G)

TGNG(T/C)(T/C)TC /GCGATGGA(T/C) CCNCA(A/G)CA(A/G)(C/A)G] y la sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS) [primer: (NRPS) MTF2/MTR GCNGG(C/T)GG(C/T)GCNTA(C/T)GTNCC (AGGAYVP, coremotifI) /CCNCG(AGT) AT(TC)TTNAC(T/C)TG(QVKIRG, coremotifV)] y las rutas biosintéticas híbridas de PKS / NRPS que constituyen la mayoría de los productos naturales conocidos (Lopes *et al*. 2012; Martins *et al*. 2013). Se debe tener en cuenta que las pruebas moleculares preliminares para búsqueda de metabolitos secundarios con los primer PKS y NRPS deben ser complementadas con bioensayos ya que algunas especies como *Lyngbya aestuarii* han presentado resultados positivos en pruebas de bioactividad como antifúngico y antilesishmania (Kumar *et al.* 2013), y resultados negativos para genes PKS NRPS (Barrios *et al.* 2007). También, Martins *et al.* 2013 diseñaron un nuevo primer [CBT_AF (5′-TTVGGYTAYGAYTTYGG-3′) y CBT_AR (5′-AGACCARGAACGRACTTC-3′)], para la búsqueda de estos compuestos sintetizados por otros clústeres de genes.

La variedad estructural de los péptidos no ribosomales se debe a sus características propias que los hacen distinguibles de los péptidos ribosomales por la presencia no sólo de los aminoácidos proteinogénicos, sino también, la de aminoácidos poco comunes y la de otros tipos de moléculas que no están presentes en los péptidos ribosomales (Tan 2007). Los compuestos policétidos son una clase diversa de compuestos creados por enzimas modulares que condensan y luego modifican cadenas de unidades de acetato o propionato principalmente a través de reacciones de reducción, deshidratación, ciclación y aromatización. Estos compuestos presentan una gran variedad estructural, al igual que una amplia gama de actividades biológicas (Tidgewell *et al.* 2010).

2.4 Cyanoprokariotas en Colombia

Colombia en el tema de cianobacterias marinas presenta contados estudios, en la parte taxonómica tenemos los trabajos de Díaz & Bula (1997), Díaz & Díaz (2003), Reyes *et al*. 2013 y Murillo & Peña 2013 (ver tabla 2), los cuales identifican taxonómicamente los organismos a partir de morfología y morfometría de acuerdo con Komárek & Anagnostidis, sin embargo, como lo menciona Engene *et al*. (2013) este tipo de caracteres taxonómicos no son suficientes para la identificación de cianobacterias marinas del trópico. Ahora bien, es importante para la identificación de estos organismos usar técnicas moleculares (utilizando el gen de la subunidad 16s del rRNA). En la literatura para cianobacterias

marinas tan sólo se encuentra a Prato (2013) realizando pruebas moleculares para la identificación taxonómica, encontrando en sus resultados que el 40% de los organismos fueron asociadas a secuencias de cianobacterias incluyendo especies sin cultivar y sin identificar, y el 19% fueron asociadas a secuencias de especies de cianobacterias marinas conocidas.

Especie	**Referencia Bibliográfica**
Microcoleus lyngbyaceus	Díaz & Bula 1997
Oscillatoria lutea	Díaz & Bula 1997
Oscillatoria submembranacea (Phormidium submembranaceum)	Díaz & Bula 1997; Díaz & Díaz 2003
Phormidium hendersonii	Díaz & Bula 1997; Díaz & Díaz 2003
Schizothrix mexicana	Díaz & Bula 1997; Díaz & Díaz 2003
Calothrix crustacea	Díaz & Bula 1997; Díaz & Díaz 2003
Phormidium sp.	Murillo & Peña 2013
Lyngbya confervoides actualmente *Okeania lorea*	Reyes *et al.* 2013; Díaz & Díaz 2003
Lyngbya penicilliformis	Reyes *et al.* 2013
Moorea producens	Reyes *et al.* 2013
Phormidium dimorphum	Reyes *et al.* 2013
Phormidium roseum	Reyes *et al.* 2013
Calothrix confervicola	Reyes *et al.* 2013
Brachytrichia quoyi	Reyes *et al.* 2013
Microcystis dimidiata	Díaz & Díaz 2003
Lyngbya aestuarii	Díaz & Díaz 2003
Lyngbya lutea	Díaz & Díaz 2003
Lyngbya majuscula	Díaz & Díaz 2003
Phormidium corallyticum	Díaz & Díaz 2003
Porphyrosiphon notarsii	Díaz & Díaz 2003
Spirulina subsala	Díaz & Díaz 2003

Schizothrix calcicola	Díaz & Díaz 2003
Schizothrix tenerrina	Díaz & Díaz 2003
Hormothamnion enteromorphoides	Díaz & Díaz 2003
Scytonema hofman-bangii	Díaz & Díaz 2003
Lyngbya sórdida	Bayona 2014
Okeania comitata anteriormente *Oscillatoria nigroviridis*	Bayona 2014
Oscillatoria margaritifera	Bayona 2014
Symploca hidmoides	Bayona 2014
Oscillatoria acuminata	Bayona 2014
Blennothrix glutinosa	Bayona 2014

Tabla 2. Cianobacterias marinas reportadas para Colombia

El estudio de metabolitos secundarios con potencial bioactivo presenta la misma situación, se tiene a Quintana (2011) donde a *Oscillatira nigroviridis* le fueron aislados lo compuestos Almiramide B y D. Quintana (2014) encuentra que los compuestos Almiramide B y D tienen alta toxicidad contra la línea celular de fibroblastos gingival y actividad leve contra líneas celulares tumorales humanas.

Por otra parte, Prato (2013) realiza pruebas de bioactividad a partir de extractos crudos de muestras ambientales de cianobacterias bentónicas arrecifales, encontrando actividad antifúngica e inhibición del quorum sensing. Finalmente tenemos a Bayona (2014), el cual a partir de un consorcio de *Lyngbya majuscula-Oscillatoria margaritifera*, fue posible aislar tres compuestos, El primero identificado como 1, 2. Dibromo – 4 – metildodeca - 9, 11 – dien - 2 - ona, el segundo y tercero Catalinamida A y Catalinamida B respectivamente, además estos dos últimos presentan actividad citotóxica y antimalárica. De otro lado, de una muestra clasificada como *Lyngbya* spp. fue posible identificar a los caylobolidos A y B, compuestos con actividad en líneas celulares tumorales.

2.5 Conclusiones

Las cianobacterias marinas son una fuente de productos naturales con alta diversidad estructural y amplias actividades biológicas de gran importancia a nivel mundial, con problemas en la taxonomía siendo necesario tener un enfoque molecular, morfológico y químico combinado.

En la actualidad, el género *Lyngbya* presenta la mayor cantidad de compuestos aislados con bioactividad y ha demostrado ser un género no definido completamente en su taxonomía.

Por último, Colombia en comparación con otros países se encuentra relegado en el tema de cyanoprokariotes, haciéndose necesario el capacitar más profesionales en esta área del conocimiento.

2.6 Bibliografía

Balunas M, Grosso M, Villa F, Engene N, McPhail K, Tidgewell K, Pineda L, Gerwick L, Spadafora C, Kyle D, Gerwick W. 2012. Coibacins A-D, new anti-leishmanial polyketides with intriguing biosynthetic origins. Organic Letters. 14:3878 –3881.

Balunas M, Linington R, Tidgewell K, Fenner A, Ureña L, Togna G, Kyle D, Gerwick W. 2010. Dragonamide E, a modified linear lipopeptide from *Lyngbya majuscula* with antileishmanial activity. Journal of Natural Products. 73:60–66.

Barrios M, Burja A, Wright P. 2007. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Volume 34(6):443–456.

Bornancin L, Boyaud F, Mahiout Z, Bonnard I, Mills S, Banaigs B, Inguimbert N. 2015. Isolation and Synthesis of Laxaphycin B-Type Peptides: A Case Study and Clues to Their Biosynthesis. Marine. Drugs 13:7285-7300.

Choi H, Engene N, Smith J, Preskitt L, Gerwick W. 2010. Crossbyanols A-D, toxic brominated polyphenyl ethers from the Hawai'ian bloom-forming cyanobacterium *Leptolyngbya crossbyana*. Journal of Natural Products. 73:517–522.

Choi H, Mascuch S, Villa F, Byrum T, Teasdale M, Smith J, Preskitt L, Rowley D, Gerwick L, Gerwick W. 2012. Honaucins A-C, potent inhibitors of inflammation and bacterial quorum sensing: synthetic derivatives and structure-activity relationships. Chemistry & Biology 19:589–598.

Choi H, Mevers E, Byrum T Valeriote F, Gerwick W. 2012. Lyngbyabellins K-N from two palmyra atoll collections of the marine cyanobacterium *Moorea bouillonii*. European Journal of Organic Chemistry. 27:5141–5150.

Choi H, Pereira A, Cao Z, Shuman C, Engene N, Byrum T, Matainaho T, Murray T, Mangoni A, Gerwick W. 2010. The hoiamides, structurally-intriguing neurotoxic lipopeptides from Papua New Guinea marine cyanobacteria. Journal of Natural Products. 73:1411–1421.

Clark B, Engene N, Teasdale M, Rowley D, Matainaho T, Valeriote F, Gerwick W. 2008. Natural products chemistry and taxonomy of the marine cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum*. Journal of Natural Products. 71: 1530–1537.

Conroy T, Guo J, Linington G, Hunt N, Payne R. 2011. Total synthesis, stereochemical assignment, and antimalarial activity of gallinamide A. Chemistry - A European Journal. 17:13544–13552.

Díaz J, Barrios L, Gómez D. 2003. Las praderas de pastos marinos en Colombia. Estructura y distribución de un ecosistema estratégico. Serie Publicaciones Especiales. Santa Marta. 10:160.

Díaz G & Bula G. 1997. Marine algae from oceanic atolls in the southwestern caribbean (Albuquerque Cays, Courtown Cays, Serrana Bank and Roncador Bank).

Díaz G & Díaz M. 2003. Diversity of benthic marine algae of the Colombian Atlantic. Biota Colombiana, 4(2): 203-243.

Edwards D, Marquez B, Nogle L, McPhail K, Goeger D, Roberts M, Gerwick W. 2004. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Chemistry & Biology. 11:817– 833.

Engene N, Choi H, Esquenazi E, Byrum T, Villa F, Murray T, Dorrestein P, Gerwick L, Gerwick W. 2011. Phylogeny-guided isolation of ethyl tumonoate A from the marine cyanobacterium cf. *Oscillatoria margaritifera*. Journal of Natural Products. 74:1737–1743.

Engene N, Choi H, Esquenazi E, Rottacker E, Ellisman MH, Dorrestein P, Gerwick W. 2011. Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived prolific secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus Lyngbya. Environmental Microbiology 13:1601–1610.

Engene N, Gunasekera S, Gerwick W, Paul V. 2013. Phylogenetic Inferences Reveal a Large Extent of Novel Biodiversity in Chemically Rich Tropical Marine Cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 79(6):1882–1888.

Engene N, Paul V, Byrum T, Gerwick W, Thor A, Ellisman M. 2013. Five chemically rich species of tropical marine cyanobacteria of the genus *Okeania* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanoprokaryota). Journal of Phycology. 49:1095–1106.

Engene N, Rottacker E, Kaštovský J, Byrum T, Choi H, Ellisman M, Komárek J, Gerwick W. 2012. *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62:1171–1178.

Engene N, Tronholm A, Salvador L, Luesch H, Paul V. 2015. Caldora penicillata gen. nov., comb. nov. (cyanobacteria), a pantropical marine species with biomedical relevance. Journal of Phycology. 51:670–681.

Grindberg R, Ishoey T, Brinza D, Esquenazi E, Coates RC, Liu W, Gerwick L, Dorrestein P, Pevzner P, Lasken R, Gerwick W. 2011. Single cell genome amplification accelerates identification of the apratoxin biosynthetic pathway from a complex microbial assemblage. PLoS One 6:e18565.

Gunasekera S, Imperial L, Garst C, Ratnayake R, Dang L, Paul V, Luesch H. 2016. Caldoramide, a modified pentapeptide from the marine cyanobacterium *Caldora penicillata*. Journal of Natural Products. 7:1867–1871.

Gutierrez M, Pereira A, Debonsi H, Ligresti A, Di Marzo V, Gerwick W. 2011. Cannabinomimetic lipid from a marine cyanobacterium. Journal of Natural Products. 74:2313–2317.

Gutierrez M, Suyama T, Engene N, Wingerd J, Matainaho T, Gerwick W. 2008. Apratoxin D, a potent cytotoxic cyclodepsipeptide from Papua New Guinea collections of the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Lyngbya sordida*. Journal of Natural Products. 71:1099 –1103.

Ito I, Butler A. 2005. Structure of synechobactins, new siderophores of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. Limnology and Oceanography 50:1918 – 1923.

Iwasaki A, Ohno O, Sumimoto S, Ogawa H, Nguyen K, Suenaga K. 2015. Jahanyne, an apoptosis-inducing lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. Organic Letters. 17:652–655.

Iwasaki A, Ohno O, Sumimoto S, Suda S, Suenaga K. 2014. Maedamide, a novel chymotrypsin inhibitor from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp, Tetrahedron Letters. 55:4126–4128.

Kumar M, Tripathi M, Srivastava A, Gour J, Singh R, Tilak R, Asthana R. 2013. Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and *Aphanothece bullosa* as antifungal and antileishmanial drug resources. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(6):458-63.

Kutschera U, Niklas K. 2005. Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. Theory in Biosciences. 2005. 124, 1–24.

Linington R, Clark B, TrimbleE, Almanza A, Ureña L, Kyle D, Gerwick W. 2009. Antimalarial peptides from marine cyanobacteria: Isolation and structural elucidation of gallinamide A. Journal of Natural Products. 72:14–17.

Linington R, González J, Ureña L, Romero L, Ortego E, Gerwick W. 2007. Venturamides A and B: antimalarial constituents of the Panamanian marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Journal of Natural Products. 70:397–401.

Lopes V, Ramos V, Martins A, Sousa M, Welker M, Antunes A, Vasconcelos V. 2012. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. Marine Environmental Research. 73:7-16.

Malloy K, Choi H, Fiorilla C, Valeriote F, Matainahoe T, Gerwick W. 2012. Hoiamide D, a marine cyanobacteria-derived inhibitor of p53/MDM2 interaction. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 22:683–688.

Malloy K, Suyama T, Engene N, Debonsi H, Cao Z, Matainaho T, Murray T, Gerwick W. 2012. Credneramides A and B: neuromodulatory phenethylamine and isopentylamine derivatives of a vinyl chloridecontaining fatty acid from a Papua New Guinea collection of *Lyngbya* sp. Journal of Natural Products. 75:60–66.

Marquez B, Watts K, Yokochi A, Roberts M, Verdier-Pinard P, Jimenez J, Hamel E, Scheuer P, Gerwick W. 2002. Structure and absolute stereochemistry of hectochlorin, a potent stimulator of actin assembly. Journal of Natural Products. 65:866–871.

Martins J, Leão P, Ramos V, Vasconcelos V. 2013. N-Terminal Protease Gene Phylogeny Reveals the Potential for Novel Cyanobactin Diversity in Cyanobacteria. Marine drugs. 11: 4902-4916.

Matthew S, Salvador L.A, Schupp P, Paul V, Luesch H. 2010. Cytotoxic halogenated macrolides and modified peptides from the apratoxin-producing marine cyanobacterium *Lyngbya bouillonii* from Guam. Journal of Natural Products. 73:1544–1552.

McPhail K, Correa J, Linington R, González J, Ortega E, Capson T, Gerwick W. 2007 Antimalarial linear lipopeptides from a panamanian strain of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Journal of Natural Products. 70:984–988.

Medina R, Goeger D, Hills P, Mooberry S, Huang N, Romero L, Ortega E, Gerwick W, McPhail K. 2008. Coibamide A, a potent antiproliferative cyclic depsipeptide from the Panamanian marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. Journal of the American Chemical Society. 130:6324–6325.

Merel S., Walker D., Chicana R., Snyder S., Baures E. & Thomas O. 2013 State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. Environment International. 59:303–327.

Mevers E, Haeckl F, Boudreau P, Byrum T, Dorrestein P, Valeriote F, Gerwick W. 2014. Lipopeptides from the tropical marine cyanobacterium *Symploca* sp. Journal of Natural Products 77:969–75.

Mevers E, Liu W, Engene N, Byrum T, Dorrestein P, Gerwick W. 2011. Cytotoxic veraguamides, Alkynyl bromide containing cyclic depsipeptides from an unusual marine cyanobacterium cf. *Oscillatoria margaritifera*. Journal of Natural Products. 74:928 –936.

Mevers E, Matainaho T, Allara M, Di Marzo V, Gerwick W. Mooreamide A: A Cannabinomimetic Lipid from the Marine Cyanobacterium *Moorea bouillonii*. Lipids. 49(11):1127-1132.

Mi Y, Zhang J, He S, Yan X. 2017. New Peptides Isolated from Marine Cyanobacteria, an Overview over the Past Decade. Marine Drugs. 15(5):132

Ministério de Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2003. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Ministério da Saúde. Brasília. 51

Mur L, Skulberg M, Utkilen H. 1999. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J, editors. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London, UK: E & FN Spon. 15-40.

Murillo M & Peña E. 2013. Algas marinas bentónicas de la Isla Gorgona, costa pacífica colombiana. Revista de Biología Tropical. 62(1):27-41.

Nunnery J, Engene N, Byrum T, Cao Z, Sairam J, Pereira A, Teatulohi M, Murray T, Gerwick W. 2012. Biosynthetically - -intriguing chlorichlorinated lipophilic metabolites from geographically distant tropical marine cyanobacteria. Journal of Natural Products. 77:4198–4208.

Okamoto S, Iwasaki A, Ohno O, Suenaga K. 2015. Isolation and structure of kurahyne B and total synthesis of the kurahynes. Journal of Natural Products. 78:2719–2725.

Pereira A, Cao Z, Engene N, Soria I, Murray T, Gerwick W. 2010. Palmyrolide A, an unusually stabilized neuroactive macrolide from Palmyra atoll cyanobacteria. Organic Letters. 12:4490–4493.

Pereira A, Etzbach L, Engene N, Müller R, Gerwick W. 2011. Molluscicidal chemotypes from a new Palmyra Atoll cyanobacterium. Journal of Natural Products. 74:1175–1181.

Pereira A, Kale A, Fenley A, Byrum T, Debonsi H, Gilson M, Valeriote F, Moore B, Gerwick W. 2012. The Carmaphycins, new proteasome inhibitors exhibiting α,β-epoxyketone warhead from a marine cyanobacterium. Chembiochem. 4, 810–817.

Pereira A, McCue C, Gerwick W. 2010. Cyanolide A, a glycosidic macrolide with potent molluscicidal activity from the Papua New Guinea cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. Journal of Natural Products. 73:217–220.

Prato J. 2013. Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su posible papel ecológico. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Tesis de Maestría en Microbiología.

Prato J & Newball R. 2015. Aproximación a la valoración económica ambiental del Departamento Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina - Reserva de Biósfera de Seaflower. Secretaría Ejecutiva de la Comisión Colombiana del Océano SECCO, Corporación para el desarrollo sostenible del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina – CORALINA. 1:16-17.

Puglisi M, Sneed J, Sharp K, Ritson R, Paul V. 2014. Marine chemical ecology in benthic environments. Natural Product Reports. 31:1510–1553.

Quintana J, Bayona L, Castellanos L, Puyana M, Camargo P, Aristizábal F, Edwards C, Tabudravu J, Jaspars M, Ramos F.2014. Almiramide D, cytotoxic peptide from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigroviridis*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 22:6789–6795.

Reyes V, Gavio B, Velasquez H. 2013. Notes on the marine algae of the international biosphere reserve Seaflower, Caribbean Colombia III. New records of Cyanophyta. Nova Hedwigia. 97(3-4):349–360.

Sanchez L, Lopez D, Vesely B, Togna G, Gerwick W, Kyle D, Linington R. 2010. Almiramides A–C: Discovery and development of a new class of Leishmaniasis lead compounds. Journal of Medicinal Chemistry 53:4187–4197.

Sasaki H, Teruya T, Fukazawa H, Suenaga K. 2011. Revised structure and structureeactivity relationship of bisebromoamide and structure of norbisebromoamide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. Tetrahedron Letters. 67:990–994.

Shih P, Wu D, Latifi A, Axen S, Fewer D, Talla E, Calteau A, Cai F, Tandeau de Marsac, N, Rippka R, 2012. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110:1053–1058.

Simmons T, Engene N, Urena L, Romero L, Ortega E, Gerwick L, Gerwick W. 2008. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigroviridis*. Journal of Natural Products. 71:1544 –1550.

Soria I, Pereira A, Cao Z, Murray T, Gerwick W. 2009. Alotamide A, a Novel Neuropharmacological Agent from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. Organic Letters. 11:4704-4707.

Sudek S, Haygood M, Youssef D, Schmidt E. 2006. Structure of trichamide, a cyclic peptide from the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*, predicted from the genome sequence. Applied and Environmental Microbiology. 72:4382– 4387.

Takayanagi A, Iwasaki A; Suenaga K. 2015. Total synthesis and stereochemical reassignment of maedamide. Tetrahedron Letters. 56:4947–4949.

Tan L. 2007. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. Phytochemistry. 68:954-79.

Tan L, Okino T, Gerwick W. 2013. Bouillonamide: a mixed polyketide-peptide cytotoxin from the marine cyanobacterium *Moorea bouillonii*. Marine Drugs 11:3015–24.

Taniguchi M, Nunnery J, Engene N, Esquenazi E, Byrum T, Dorrestein P, Gerwick W. 2010. Palmyramide A, a cyclic depsipeptide from a Palmyra atoll collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Journal of Natural Products. 73:393–398

Teruya T, Sasaki H, Fukazawa H, Suenaga K. 2009. Bisebromoamide, a potent cytotoxic peptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp.: Isolation, stereostructure, and biological activity. Organic Letters. 11:5062–5065.

Thacker R, Paul V. 2004. Morphological, chemical, and genetic diversity of tropical marine cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (Oscillatoriales). Applied and Environmental Microbiology. 70:3305–3312.

Thajuddin N. & Subramanian G. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. Current Science. 89: 50-57.

Tidgewell K, Clark B, Gerwick W. 2010. The Natural Products Chemistry of Cyanobacteria. In Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology; Mander, L., Lui, H.-W., Eds.; Elsevier: Oxford, UK. 2:141–188

Tidgewell K, Engene N, Byrum T, Media J, Doi T, Valeriote F, Gerwick W. 2010. Evolved diversification of a modular natural product pathway: apratoxins F and G, two cytotoxic cyclic depsipeptides from a Palmyra collection of Lyngbya bouillonii. Chembiochem 11:1458 –1466.

Whitton B & Potts M. 2000. The Ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic, Dordrecht, Paises Bajos. 1-19.

Williamson R, Boulanger A, Vulpanovici A, Roberts M, Gerwick W. 2002. Structure and absolute stereochemistry of phormidolide, a new toxic metabolite from the marine cyanobacterium *Phormidium* sp. Journal of Organic Chemistry 7:7927–7936.

Wang L, Xu Z, Ye T. 2011. Total synthesis of hoiamide C. Organic Letters. 13:2506–2509.

3. Aislamiento, identificación y conservación *in vitro* de cyanoprokariotas bentónicas arrecifales de Providencia y Santa Catalina Islas

3.1 Resumen

Aunque Colombia cuenta con el 44,86% de su extensión como territorio marino, los cyanoprokariotes son un grupo poco estudiado en el país, siendo estos organismos fotosintéticos importantes productores de metabolitos secundarios con diversas y amplias actividades biológicas. El objetivo de la presente investigación fue aislar cyanoprokariotes bentónicos marinos de Providencia y Santa Catalina Islas, y evaluar 7 medios de cultivo para conservación *in vitro*. Para el aislamiento se realizaron técnicas de rayado en agar y repiques continuos en medio nutritivo líquido BG11; para conservación *in vitro* se evaluaron los medios solidos nutritivos BG11 medium, C medium, ASNIII medium, Z8 medium, SN medium, F/2 medium y ES medium, suplementados con sal marina (25 g / l). Los cultivos *in vitro* se mantuvieron durante 50 días, con una intensidad de luz de 16,2 µmol m^{-2} s^{-1}, fotoperiodo 12:12 luz /oscuridad y una temperatura promedio de 23 °C. Se hicieron cinco replicas por cepa. Se evaluó el crecimiento de acuerdo con el área de colonización e intensidad de color en cada cultivo, mediante programa ImageJ (software de libre acceso). Se obtuvieron 25 cepas aisladas pertenecientes a los géneros *Leptolyngbya*, *Stanieria* y *Synechococcus*. El medio nutritivo ASN-III mostró mejores resultados para el crecimiento y mantenimiento *in vitro* de los cyanoprokariotes bajo las condiciones de estudio.

Palabras clave: cianobacterias, cepa algal, 16s, ASNIII, Caribe.

Abstract

Although Colombia has 44.86% of its extension as a marine territory, cyanoprokariotes are a group little studied in the country, these photosynthetic organisms being important producers of secondary metabolites with diverse and extensive biological activities. The objective of the present investigation was to isolate marine benthic cyanoprokariotes from Providencia and Santa Catalina Islas, and to evaluate 7 culture media for in vitro conservation. For the isolation, continuous agar and scratch techniques were performed in liquid nutrient medium BG11; for in vitro conservation, nutritious solid media BG11 medium, C medium, ASNIII medium, Z8 medium, SN medium, F / 2 medium and ES medium, supplemented with sea salt (25 g / l) were evaluated. In vitro cultures were maintained for 50 days, with a light intensity of 16.2 µmol m-2 s -1, photoperiod 12:12 light / dark and an average temperature of 23 ° C. Five replicates were made per strain. Growth was evaluated according to the area of colonization and intensity of color in each culture, by means of the ImageJ program (free access software). We obtained 25 isolates belonging to the genera Leptolyngbya, Stanieria and Synechococcus. The nutrient medium ASN-III showed better results for the growth and in vitro maintenance of the cyanoprokariotes under the study conditions.

Key words: cyanobacteria, algal strain, 16s, ASNIII, Caribbean.

3.2 Introducción

Los cyanoprokariotes conocidos como cianobacterias y/o algas verde-azules son un grupo de organismos procariotas que al igual que las plantas superiores utilizan luz, CO2, agua y otras sustancias en la obtención de energía necesaria para crecer. Su origen se aproxima a los 3500 millones de años (Wehr *et al*. 2002), poseen una gran variedad morfológica, estructural y fisiológica, encontrándolos en ecosistemas dulceacuícolas, marinos, de suelo, rocas y ambientes extremos (Whitton & Potts, 2000; Wehr *et al*. 2002). Presentan un papel importante en la fijación de nitrógeno (Whitton & Potts, 2000) y un gran potencial en la producción de moléculas bioactivas (metabolitos secundarios) utilizadas como agentes terapéuticos, de control biológico y ficopigmentos entre otros (Muñoz, 2012). Gracias a los avances biotecnológicos en la actualidad para diferentes áreas del conocimiento son organismos de un alto valor económico (Singh *et al*. 2017).

Las posibles aplicaciones de los cyanoprokariotes como recurso biológico, son sobresalientes frente a otros grupos de microorganismos, siendo de gran importancia el aislamiento, caracterización bioquímica e identificación taxonómica (Galhano *et al*. 2011). Tradicionalmente se ha realizado la identificación basada en las características morfológicas, ecológicas, fisiológicas, sin embargo, esta clasificación no ha sido efectiva para cyanoprokariotes marinos del neotrópico debido a que las claves taxonómicas usadas son principalmente de organismos europeos de agua dulce, encontrándonos con algunos apartados para organismos dulceacuícolas del nuevo mundo y muy pocos para los de ecosistemas marino tropicales, En este sentido tenemos a Thacker & Paul (2004) Engene *et al*. (2010, 2011, 2012, 2013a, 2013b) que proponen cambios principalmente en el orden de las Oscillatoriales, teniendo en cuento no solo los caracteres morfológicos, si no también, su diversidad química (metabolitos secundarios). Adicionalmente en los últimos años se han sumado los aspectos bioquímicos y moleculares bajo amplificación por PCR de regiones conservadas del gen 16s rRNA (Galhano *et al*. 2011). El conocimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas en cultivos de laboratorio, en un amplio rango de parámetros puede ayudar a determinar el potencial biotecnológico, al igual que fijar e interpretar de manera más eficiente los resultados adquiridos del crecimiento de estos microorganismos en su ambiente natural. (Fuenmayor *et al*. 2009).

En las últimas décadas. han aumentado el desarrollo de técnicas de cultivo cuyo objetivo principal es la obtención de biomasa como fuentes de proteínas, lípidos, exopolisacáridos, y ficopigmentos (clorofila, carotenos y ficobiliproteínas) (Rosales *et al*., 2008), con miras a la industria. Estos organismos tienen eficiencia fotosintética y tasas de reproducción altas, ciclos de vida cortos y pueden comportarse de manera autótrofa, heterótrofa o mixotrofica (Sánchez, 2000). En la producción de biomasa de cyanoprokariotes marinos se presenta como factor limitante la incorporación de hierro (Fe) por su baja solubilidad en su forma Fe(III), su lenta cinética de reacción y su activo ciclo de óxido-reducción (Hassler & Twiss 2006), por tal motivo la incorporación de un agente quelante orgánico (ácido etilendiaminotetraacético - EDTA) para formar Fe(III)EDTA, una molécula asimilable para los cyanoprokariotes mejorando la eficiencia de los cultivos (Sunda *et al*. 2005).

El presente trabajo está dirigido a conocer los cyanoprokariotes cultivables de Providencia y Santa Catalina Islas – Colombia bajo condiciones de laboratorio con diferentes medios nutritivos, realizando un proceso de aislamiento mediante repiques continuos en medio líquido y estriado en placa e identificación taxonómica por características morfológicas y moleculares.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Lugar de muestro

Para este trabajo se realizó un muestreo, en la localidad de Felipe´s Place, ubicada al nor-occidente de la isla de Providencia a una profundidad de entre 10 y 20 m, y en el costado suroriental de la isla Santa Catalina, en la zona intermareal con coordenadas geográficas 13° 22’ 50,273” Norte; 81° 22’ 29,612” Oeste y 13° 22’ 52,407” Norte; 81° 23’ 31,719” Oeste respectivamente (Figura 1).

Providencia y Santa Catalina Islas forman parte del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, localizadas al Noroccidente de Colombia, en el Mar Caribe. Poseen una superficie de 22 Km^2, una máxima elevación de 360 m.s.n.m. en el sector central y una temperatura promedio entre 26° y 32° centígrados (C). Además, presenta un complejo arrecifal coralino que tiene una longitud aproximada de 22 Km, siendo la segunda

en extensión del caribe después de la de Belice (Alcaldía de Providencia y Santa Catalina Islas - San Andrés. 2016).

Figura 1. Estaciones de muestreo en las Islas de Providencia y Santa Catalina. (A) Felipe´s Place. (B) Costado suroriental de la isla de Santa Catalina. Tomado y modificado de Google Earth ©

Las muestras se tomaron de manera manual, se depositaron en tubos falcón de 50 ml con 30 ml de medio nutritivo BG11 (Allen 1968; Allen & Stanier, 1968; Rippka *et al*., 1979 en Andersen, 2005) enriquecido con sal marina (25 g / l) previamente esterilizado mediante autoclave a 121 °C durante 60 minutos a 103 KPa. Se almacenaron en nevera de icopor y fueron trasladas al Laboratorio de Cultivo de Algas de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Las muestras se adaptaron a las condiciones del laboratorio fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad y 23° C +/- 2° C e intensidad de luz de 12,15 µmol m^{-2} s^{-1} durante 15 días.

Luego se sembraron en un erlenmeyer de 500 ml con 300 ml de medio nutritivo BG11 (Allen 1968; Allen & Stanier, 1968; Rippka *et al*., 1979 en Andersen, 2005).

3.3.2 Aislamiento

El aislamiento de cyanoprokariotes se realizó por estriado en placas y repiques continuos en medio líquido de acuerdo con Andersen (2005) y Valencia (2004), en medio nutritivo BG11 (Allen, 1968; Allen & Stanier, 1968; Rippka *et al*., 1979 en Andersen, 2005), fotoperiodo 12:12 luz / oscuridad, temperatura de 23° C +/- 2° C e intensidad de luz de 27 µmol m^{-2} s^{-1}

Estriado en placas

En medio nutritivo solidificado con agar – agar al 1% y en la cámara de flujo laminar previamente esterilizada por luz UV, se tomó con un asa redonda una fracción de la muestra y se realizó rayado en zigzag. Al cabo de 15 días a los cultivos que evidenciaron crecimiento se repicaron nuevamente, esto se repitió hasta que se obtuvieron cepas unialgales.

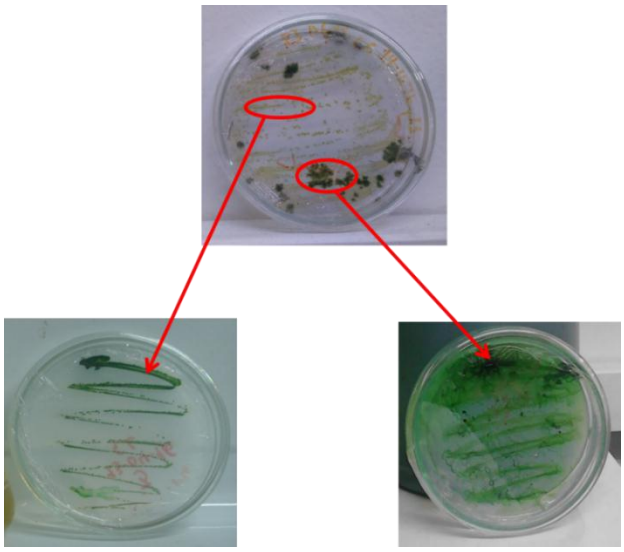

Figura 2. Aislamiento por estriado en placas

Repique continuo en medio liquido

En recipientes de vidrio con 250 ml de medio nutritivo liquido se sembró una fracción de la muestra y se sellaron con tapones de algodón para favorecer el intercambio gaseoso. Al

cabo de 15 días, las muestras que presenten crecimiento se observaron al microscopio y se procedió a repicar nuevamente medio nutritivo líquido hasta obtener cepas unialgales.

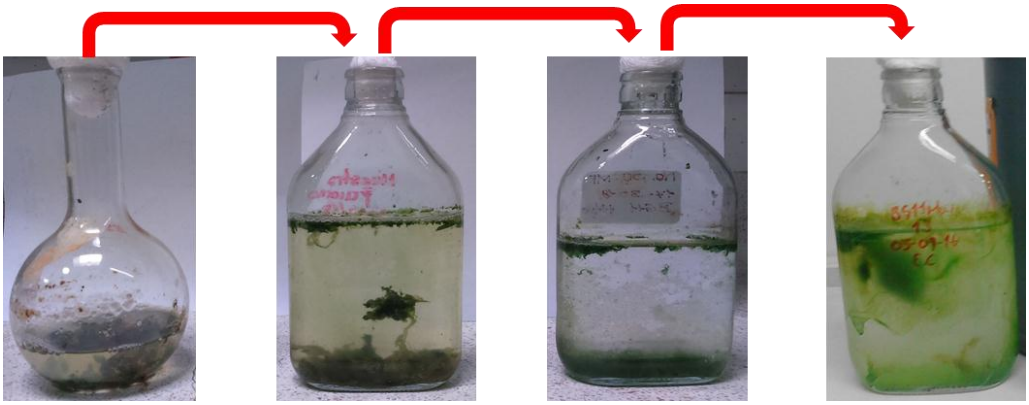

Figura 3. Aislamiento por repique continuo en medio nutritivo líquido

3.3.3 Identificación taxonómica

Morfología y morfometría

La determinación taxonómica se hizo mediante observación microscópica (microscopio óptico Olympus CX31) y se identificaron de acuerdo a Komarek *et al*. (2014), y Komarek & Anagnóstidis (1989, 1998; 2005).

Técnicas moleculares

La extracción de DNA se realizó con kit de extracción Quick-DNA Fungal/Bacterial Kit D6005 Zymo Research siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó con un NanoDrop 2000 UV-Vis Thermo Scientific, se verificó en un gel de agarosa al 1% (TAE 1X), 90 V por 40 min y se visualizó en un transiluminador UV.

La amplificación por PCR del gen 16S ARNr se realizó en un volumen final de 20 µl, el cual contenía Buffer Supreme NZY Taq 2x Green Master Mix, $MgCl_2$ 2,5mM, dNTPs 0,2 mM, 2U de ADN polimerasa, 150 ng de ADN genómico aproximadamente y de 0,5 mM de cada uno de los primers Forward y Reverse. Los primers empleados fueron los CYAN359F (5’ GGGGAATYTTCCGCAATGGG-3’) y CYAN781R (5’-GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT-3’), con un producto esperado de 422 pb (Nübel *et al*. 1997). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador BIO-RAD MyCycler Thermal Cycler, con un perfil térmico de 92 °C por 2 min, 35 ciclos de 92 °C por 20 s, 52 °C por 30 s 72 °C por 1 min; seguido de una temperatura de 72 °C por 5 min. Los productos

derivados de la PCR se movilizaron en un gel de agarosa al 1 % (TAE 1X) y se visualizaron en un transiluminador UV.

La secuenciación se realizó el método de dideoxi o Sabger, en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

3.3.4 Conservación *in vitro*

Cinco cepas de cyanoprokariotes previamente aisladas (3 *Leptolyngbyas* 1 *Stanieria* y 1 *Synechococcus*), se sembraron en tubos de ensayo 10 ml con tapa rosca, se adiciono 6 ml de medio nutritivo BG-11 (Allen 1968; Allen & Stanier, 1968; Rippka *et al*., 1979 en Andersen 2005), ASNIII (Rippka 1988 en Andersen, 2005), ES (Provasoli 1968 en Andersen, 2005), F/2 (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975 en Andersen 2005), SN (Waterbury *et al*., 1986 en Andersen, 2005), CMM (Ichimura, 1971; Watanabe *et al*., 2000 en Andersen, 2005) y Z8 (Kotai, 1972) (Tabla 3), todos enriquecidos con sal marina (25 g / l), solidificados con agar – agar [15 g / l, y un BG11 sin adición de sal marina. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento.

Componente	Concentración (M)						
	BG-11	**ASN-III**	**ES**	**Z8**	**F/2**	**SN**	**CMM**
Ácido cítrico	$3{,}12 * 10^{-5}$	$1{,}56 * 10^{-5}$	----	----	----	----	----
Citrato de hierro amonio	$\sim 3 * 10^{-5}$	$\sim 9 * 10^{-6}$	----	----	----	$2{,}29 * 10^{-5}$	----
$NaNO_3$	$1{,}76 * 10^{-2}$	$8{,}82 * 10^{-3}$	$8{,}24 * 10^{-4}$	$5{,}49 * 10^{-3}$	$8{,}82 * 10^{-4}$	$9{,}00 * 10^{-3}$	----
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	$1{,}75 * 10^{-4}$	$3{,}29 * 10^{-3}$	----	----	----	----	----
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$3{,}04 * 10^{-4}$	$1{,}42 * 10^{-2}$	----	$1{,}01 * 10^{-4}$	----	----	$1{,}62 * 10^{-4}$
$CaCl_2 \cdot 2H2O$	$2{,}45 * 10^{-4}$	$3{,}40 * 10^{-3}$	----	----	----	----	----
Na_2CO_3	$1{,}89 * 10^{-4}$	$2{,}41 * 10^{-4}$	----	$1{,}98 * 10^{-4}$	----	$1{,}00 * 10^{-4}$	----
$MgNa_2EDTA \cdot H_2O$	$8{,}37 * 10^{-6}$	----	----	----	----	----	----
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	----	$9{,}84 * 10^{-3}$	----	----	----	----	----
KCl	----	$6{,}71 * 10^{-3}$	----	----	----	----	----
Mg EDTA	----	$1{,}59 * 10^{-6}$	----	----	----	----	----
Tris base	----	----	$8{,}26 * 10^{-4}$	----	----	----	$4{,}13 * 10^{-3}$
Na_2 β-glicerofosfato $\cdot H_2O$	----	----	$4{,}63 * 10^{-5}$	----	----	----	----
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	----	----	1,13 * 10-5	----	----	$1{,}50 * 10^{-5}$	----
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	----	----	$8{,}95 * 10^{-6}$	----	----	----	----
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	----	----	----	----	$3{,}62 * 10^{-5}$	----	----
K_2HPO_4	----	----	----	$1{,}78 * 10^{-4}$	----	$9{,}90 * 10^{-5}$	----
KNO_3	----	----	----	----	----	----	$9{,}89 * 10^{-4}$
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	----	----	----	$2{,}49 * 10^{-4}$	----	----	$6{,}35 * 10^{-4}$
Na_2 β-glicerofosfato $\cdot 5H_2O$	----	----	----	----	----	----	$1{,}63 * 10^{-4}$

Metales Traza							
H_3BO_3	$4{,}63 * 10^{-5}$	$4{,}60 * 10^{-5}$	$9{,}25 * 10^{-5}$	$5{,}01 * 10^{-6}$	----	----	----
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	$9{,}15 * 10^{-6}$	$9{,}14 * 10^{-6}$	----	----	$9{,}10 * 10^{-7}$	$7{,}08 * 10^{-6}$	$5{,}46 * 10^{-7}$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$7{,}65 * 10^{-7}$	$7{,}72 * 10^{-7}$	$3{,}82 * 10^{-6}$	$9{,}98 * 10^{-8}$	$7{,}65 * 10^{-8}$	$7{,}72 * 10^{-7}$	----
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$3{,}16 * 10^{-7}$	$3{,}16 * 10^{-7}$	----	$5{,}00 * 10^{-8}$	$3{,}93 * 10^{-8}$	----	----
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	$1{,}61 * 10^{-6}$	$1{,}61 * 10^{-3}$	----	----	$2{,}60 * 10^{-8}$	$1{,}61 * 10^{-6}$	$1{,}56 * 10^{-7}$
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	$1{,}70 * 10^{-7}$	$1{,}70 * 10^{-7}$	----	$5{,}01 * 10^{-8}$	----	$8{,}59 * 10^{-8}$	----
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	----	----	$1{,}71 * 10^{-4}$	----	$1{,}17 * 10^{-5}$	----	----
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	----	----	$8{,}95 * 10^{-6}$	$1{,}04 * 10^{-5}$	$1{,}17 * 10^{-5}$	----	$2{,}15 * 10^{-6}$
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	----	----	$3{,}64 * 10^{-5}$	$9{,}99 * 10^{-7}$	----	----	----
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	----	----	$8{,}48 * 10^{-7}$	----	----	----	----
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	----	----	----	----	$4{,}20 * 10^{-8}$	----	$5{,}09 * 10^{-8}$
Ácido Cítrico $\cdot H_2O$	----	----	----	----	----	$3{,}25 * 10^{-5}$	----
Na_2EDTA	----	----	----	----	----	----	$8{,}06 * 10^{-6}$
$ZnCl_2$	----	----	----	----	----	----	$2{,}30 * 10^{-7}$
HCl	----	----	----	$1 * 10^{-5}$	----	----	----
EDTA	----	----	----	$1{,}27 * 10^{-5}$	----	----	----
NaOH	----	----	----	$9{,}5 * 10^{-6}$	----	----	----
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	----	----	----	$1 * 10^{-8}$	----	----	----
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 2H_2O$	----	----	----	$7{,}33 * 10^{-9}$	----	----	----
KBr	----	----	----	$1{,}01 * 10^{-7}$	----	----	----
KI	----	----	----	$4{,}99 * 10^{-8}$	----	----	----
$Cd(NO_3) \cdot 4H_2O$	----	----	----	$5{,}02 * 10^{-8}$	----	----	----
$NiSO_4(NH_4)_2 \cdot 6H_2O$	----	----	----	$5{,}04 * 10^{-8}$	----	----	----
$Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	----	----	----	$1{,}02 * 10^{-8}$	----	----	----
V_2O_5	----	----	----	$4{,}89 * 10^{-9}$	----	----	----
$Al_2(SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 24H_2O$	----	----	----	$4{,}99 * 10^{-8}$	----	----	----
Vitaminas							
Cyanocobalamina (vitamina B12)	----	$7{,}39 * 10^{-9}$	$1{,}48 * 10^{-10}$		$3{,}69 * 10^{-10}$	$7{,}38 * 10^{-10}$	$7{,}38 * 10^{-11}$
Tiamina $\cdot$ HCl (vitamina B1)	----	----	$2{,}96 * 10^{-8}$		$2{,}96 * 10^{-7}$	----	$2{,}97 * 10^{-8}$
Biotina (vitamina H)	----	----	$4{,}09 * 10^{-10}$		$2{,}05 * 10^{-9}$	----	$4{,}09 * 10^{-10}$

Tabla 3. Composición química de medios nutritivos enriquecidos con sal marina

Para evaluar los tratamientos se midieron las variables de cobertura, intensidad de color (donde a mayor intensidad de color indica mayor cantidad de organismos en una misma área), supervivencia y activación del crecimiento, para lo cual se tomaron fotografías a las diferentes unidades experimentales de cada tratamiento durante 50 días, para después ser analizadas utilizando el software de libre acceso ImageJ Fiji (Schindelin 2012).

La cinética de crecimiento se determinó por cobertura de área de las cianoprokariotas en los medios sólidos.

Teniendo en cuenta que medir las cinéticas de crecimiento de cianobacterias filamentosas presenta un grado de error, se diseñó un índice de crecimiento para medios sólidos de agar:
Índice de crecimiento: (S*0.1) + (C*0.1) + (AC*0.3) + (IC+0.5)
Donde:
S: supervivencia 0=no sobrevive, 1=sobrevive
C: crecimiento 0=no crece, 1=crece
AC: área de colonización
IC: Intensidad de color (medida adimensional)

El análisis estadístico se realizó primero verificando los supuestos de aleatoriedad con las pruebas corridas arriba y abajo de la mediana, corridas arriba y abajo, prueba de Box-Pierce, normalidad con las pruebas de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov; y homogeneidad de varianzas con la prueba de Barlett. Para comparar los distintos tratamientos se realizó análisis de varianza (ANOVA) a una vía y prueba de Kruskal-Wallis con nivel de significancia de 0,05 seguidos por pruebas de comparación de Tukey para establecer los tratamientos causantes de las diferencias estadísticas.

3.4 Resultados

Se obtuvieron 25 cepas unialgaes de cyanoprokariotes, 13 por la técnica de estriados en placa con 4 morfotipos diferentes y 12 por repiques continuos en medios líquido de un solo morfotipo. La identificación taxonómica por características morfológicas se logró llegar a género *Leptolynbya*, *Stanieria* y *Synechococcus* (Tabla 4).

3.4.1 Identificación taxonómica

Identificación morfológica y morfométrica:

Leptolyngbya está representada con 21 cepas, dentro de este grupo tenemos un organismo con ancho de tricoma 1,5 µm, presencia de vaina, filamentos isopolares y reproducción por hormogonios (*Leptolyngbya* sp 1, figura 4), y las veinte cepas restantes son filamentos isopolares con vaina, tilacoides parietales y un ancho del tricoma de 2 µm

(*Leptolyngbya* sp 2, figura 5). Adicional se encontró un *Leptolyngbya* sp3, morfológicamente igual a sp 2, pero con fisiología de crecimiento diferente.

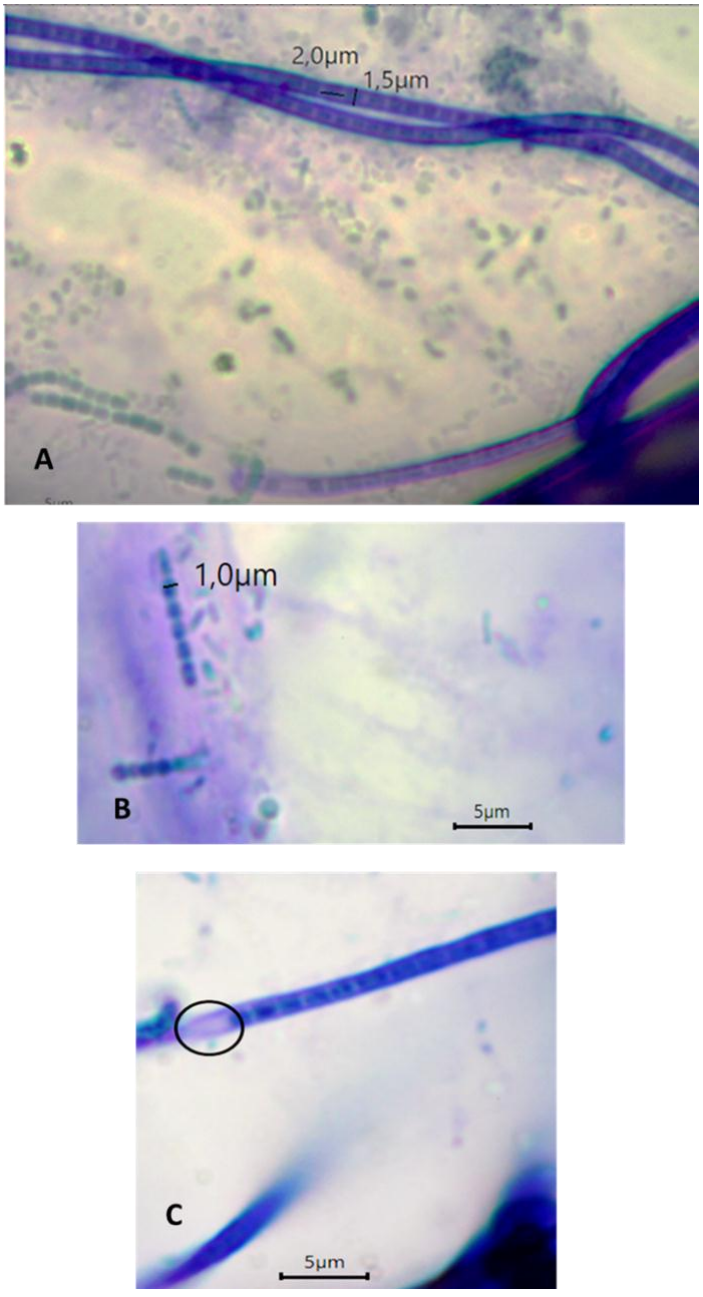

Figura 4. *Leptolyngbya* sp. 1 con tinción de azul de metileno. A. Tamaño de células del tricoma. B. Hormogonio. C. Presencia vaina.

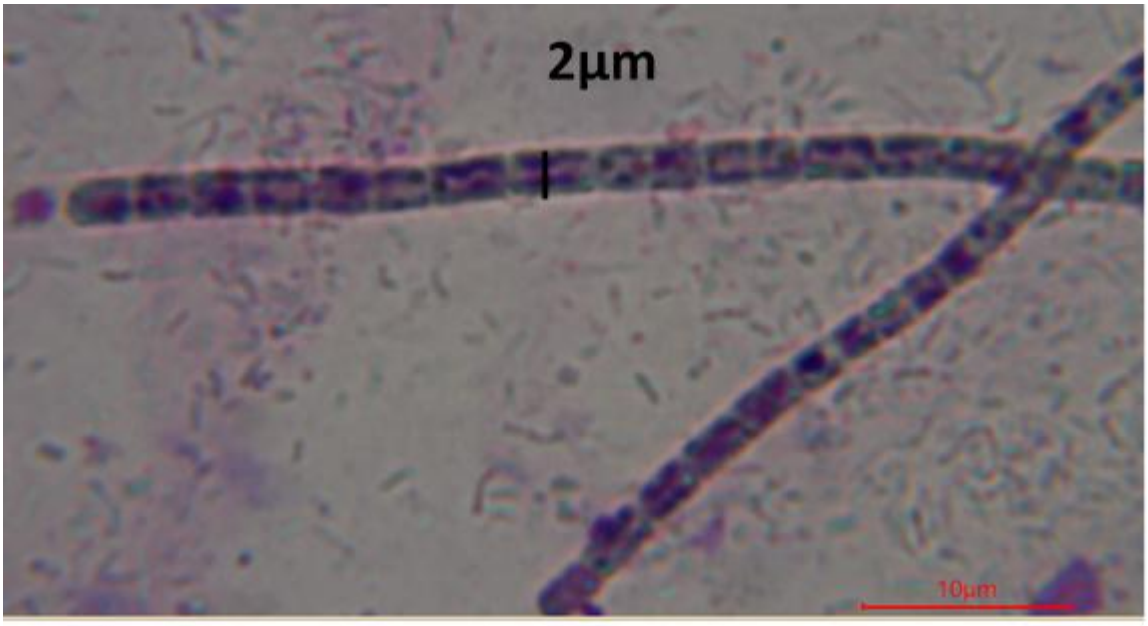

Figura 5. *Leptolyngbya* sp. 2 con tinción de azul de metileno.

Komárek & Anagnostidis (2005), describe el género *Leptolyngbya* como: "*filamentoso; con filamentos largos, solitarios o enrollados en racimos y esteras finas (que a veces son macroscópicas y de varios cm de diámetro), arqueadas, onduladas o intensamente enrolladas, isopolares, delgadas, finas, 0.5-3.2 µm de ancho, simples, delgadas pero firmes, generalmente vainas facultativas incoloras abiertas en el extremo apical; vainas unidas a los tricomas o ligeramente distantes de ellos, que envuelven a solo uno, muy raramente (en secciones cortas) dos tricomas; raramente hasta muy raramente con ramificación falsa (más común bajo condiciones especiales de cultivo), generalmente con una sola rama lateral. Tricomas finos, cilíndricos, generalmente no atenuados hasta los extremos o levemente atenuados, con células apicales redondeadas o cónicas, no estrechadas o contraídas en las paredes cruzadas, no móviles. Células isodiamétricas o más largas que anchas, cilíndricas, con contenido homogéneo, sin aerotopos, raramente con gránulos prominentes escasos, azul-verde pálido, grisáceo, verde oliva, amarillento o rojizo; células terminales sin paredes celulares engrosadas o calyptras. Heterocitos y acinetos ausentes. Las células se dividen por una fisión binaria simétrica (rara vez asimétrica), las células crecen en tamaño original antes de la siguiente división. Reproducción por hormogonia, Liberada en los extremos del tricoma, fragmentada sin la ayuda de células necrídicas típicas, pero a veces después de la muerte de las células. La taxonomía no es bien conocida con respecto a su simplicidad morfológica. Género muy*

común con muchos descritos, pero todos necesitan reevaluación taxonómica y definición de características diacríticas; muchas especies fueron descritas bajo los nombres genéricos "Lyngbya", "Phormidium" y "Plectonema".

Stanieria con tres cepas aisladas con células de forma y tamaño irregular, reproducción por baeocitos.

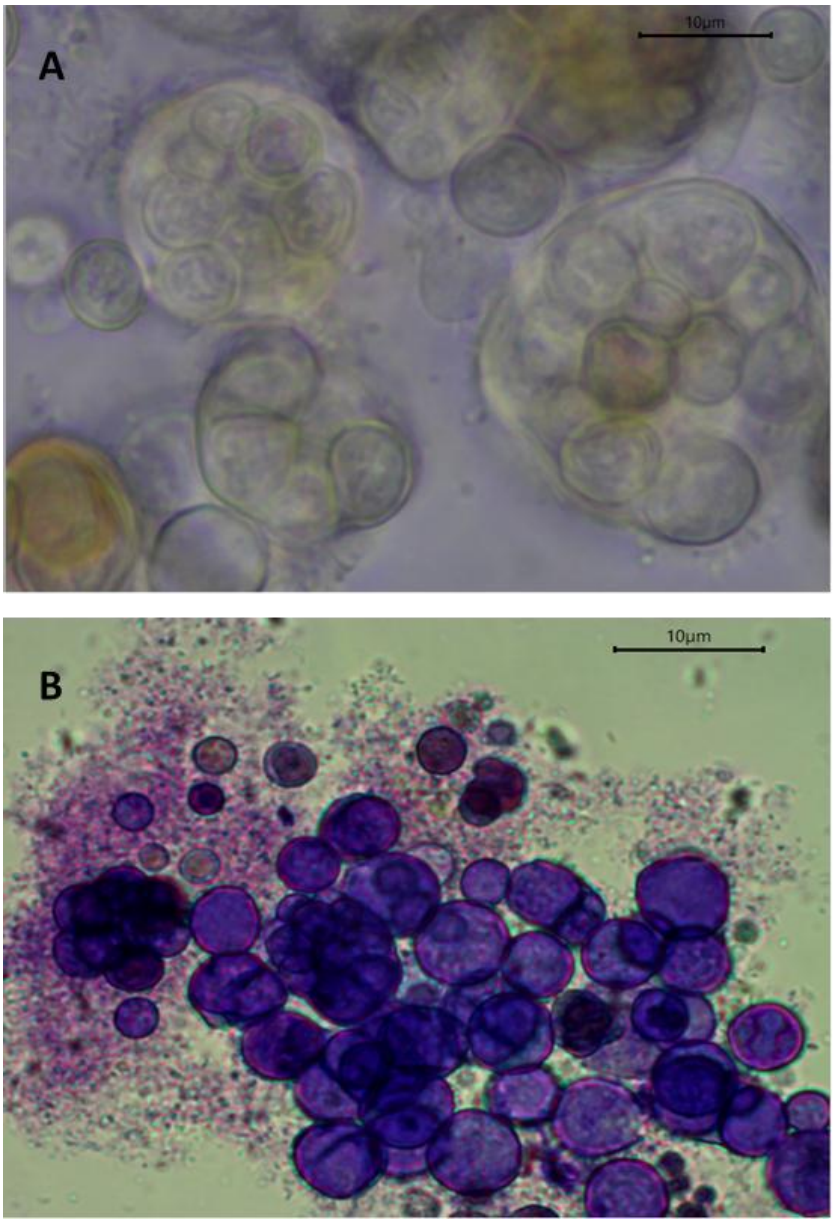

Figura 6. *Stanieria* sp. A. Formación de baeocitos. B. Organismo con tinción de azul de Metileno.

Stanieria (figura 6), es un género con *células solitarias (hasta de 40 µm de diámetro) o grupos irregulares de células, unidas al sustrato y entre sí. Células esféricas o ligeramente ampliamente ovales, unidas al sustrato por cualquier parte de la pared celular. Alrededor de las células, vainas firmes, delgadas e incoloras, se abrieron en cualquier lugar de la superficie durante la reproducción. Contenido de células grisáceas azul-verde o rojizo, tilacoides en fascículos paralelos en la capa periférica o irregularmente a través del volumen de la célula completa; siempre sin aerotopos Reproducción por la división celular total casi espontánea (fisión múltiple) en muchas células hijas pequeñas (Baeocitos); Los baeocitos son móviles y escapan de la envoltura firme y estratificada a través de una abertura irregular. Todas las células se dividen obligatoriamente una sola vez en baeocitos, que crecen en el tamaño y forma original antes de la siguiente división.* (Komárek & Anagnostidis 1998).

Synechococcus con una sola cepa, sus células se reproducen por fisión binaria, generalmente se observan dos células unidas o en algunas ocasiones formando un pseudofilamento, tilacoides parietales.

Synechococcus (figura 7), organismos *unicelulares; con células solitarias o aglomeradas en grupos, pero sin mucílago común, ovales, ampliamente ovales o en forma de varillas, a veces curvas o sigmoideas, redondeadas en los extremos, con contenido homogéneo o con varios gránulos polares dispersos o solitarios, generalmente azul-verde pálido, rara vez verde oliva, azul verdoso brillante o rosado, inmóvil. Sin adaptación cromática. Tilacoides localizados a lo largo de las paredes de las células. División celular por fisión binaria, perpendicular al eje más largo de la celda, es decir, en el mismo plano en sucesivas generaciones; las células hijas crecen más o menos en el tamaño original antes de la próxima división. Después de la división, las células se separan o quedan dispuestas en filas cortas (pseudofilamentos) de varias células, conectadas libremente con sus extremos. Synechococcus es un importante organismo modelo experimental, cuyas cepas crecen bien en diferentes tipos de cultivos* (Komárek & Anagnostidis 1998).

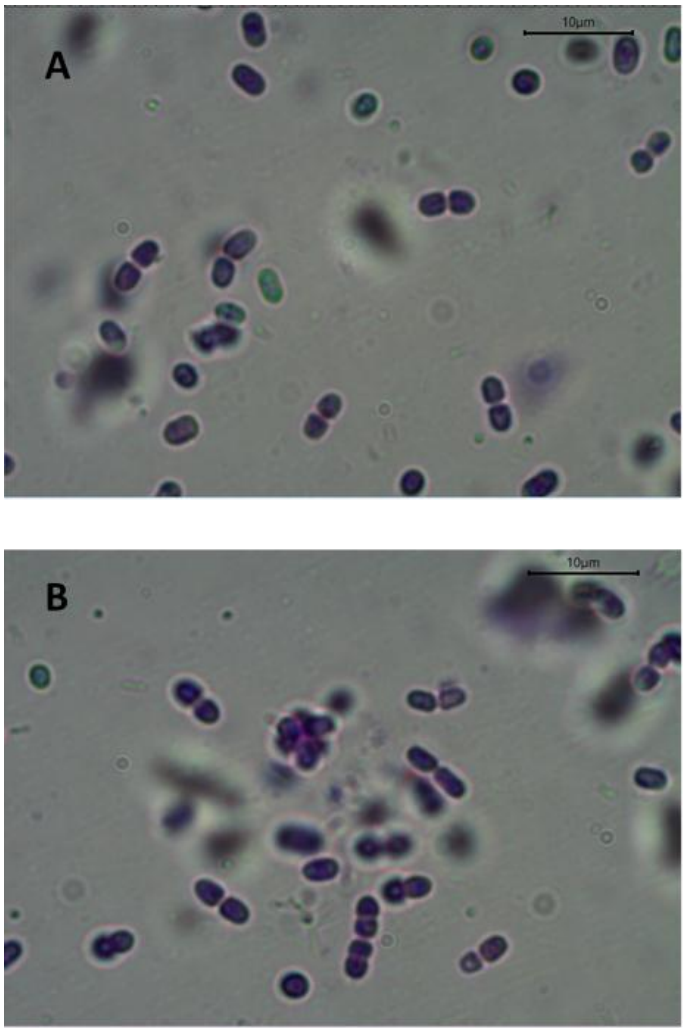

Figura 7. A y B, *Synechococcus* sp. con tinción de azul de metileno.

Identificación molecular:

A partir del gen 16s ARNr se logró identificar de las 25 cepas aisladas, una cepa como *Synechococcus* sp, 4 cepas como cyanoprokariotes no cultivados, 4 cepas no identificadas debido a que las secuenciaciones quedaron incompletas y 16 cepas como *Leptolyngbya* cf. *valderiana* (Tabla 4).

Cepa	Secuencia	Identificación morfológica	Identificación molecular	Aislamiento
1	TCAGTCTTTAACGGCAGACTTGATAAAC CGCCTACGGACGCTTTACGTCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTCTT ACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCC GATGCTGATCCTCAGGTACCGTCAGAAC TTCTTCCCTGAGAAA	*Leptolyngbya* sp. 1	Cyanoprokariote no cultivada	Solido
2	AGCGTCAGGTTCGGCCGGGGAGAGGCC TTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCAGGG AAGAAGAACTGACGGTACCTGAGGAATT CCCTCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCTTT TCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGG CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA AAGCGTTCGTAGGCGGCGTTTCAAGTCT GCTGTCAAAGGCCGAGGCTCAACTCCT CGGAAAGGCAGTGGAAACTGAAAAGCT AGAGGTCGGTAGGGGCAGA	*Leptolyngbya sp. 2*	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido
3	GTAAACTCCTTTTCTCAGGGAAGAAGAA CTGACGGTACCTGAGGAATCAGCCTCG GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCG GCGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGA GGCTCAACTTCGGAAAGGCAGTGGAAA CTGAAAAGCTAGAGGTCGGTAGGGGCA GA	*Leptolynbya* sp. 3	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido
4	CTCAGGTACCGTCAGTTCTTCTTCCCTG AGAAACGGTGAAATGCGTAGATATTGGG AAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTG CTGGCCGATCCT	*Leptolynbya* sp. 2	Secuencia corta para blast	Líquido
5	CTGAAAAGCTAGAGGTCGGTACAACCAA AGCCTCTCCCCCACGCGGCGTGCCCCG AACGGATATTGGGAAGAAC	*Leptolynbya* sp. 2	Secuencia corta para blast	Líquido
6	AGCAAGGCCTTTGGGTTGTAAACTCCTT TTCTCAGGGAAGAAGAACTTCGACGGTA CCTGAGGAATTCCCTCAGCCTCGGCTAA CTCCGTGCTTTTCAGCAGCCGCGGTAAT ACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAAT TATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCGG CGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGAG GCTCAACTCCTCGGAAAGGCAGTGGAA ACTGAAAAGCTAGAGGTCGGTAGGGGC AGA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido
7	GGGTGTCAGTTACGGCCCAGTTGAGCG CCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCCAATAT CTACGCATTTCACCGCTACACTGGGAAT TCCCTCAACCCCTACCGTACTCTAGCTT ACCAGTTTCCACCGCTCTCCAGAAGTTA AGCTTCTGTCTTTAACAGCAGACTTGATT AGCCACCTGCGGACGCTTTACGCCCAAT AATTCCGGATAACGC	*Stanieria* sp.	Cyanoprokariote no cultivada	Solido

8	ATACCCAAAATTATTGGGCGTAAAGCGT CCGCAGGTGGCTAATCAAGTCTGCTGTT AAAGACAGAAGCTTAACTTCTGGAGAGC GGTGGAAACTGGTAAGCTAGAGT	*Stanieria* sp.	Cyanoprokariote no cultivada	Solido
9	CTCAGTGTCAGTTACGTGAGGGAGGAG GTCTTTGGATTGTAAACCTCTTTTCTACA GGGAAGAATACTGACGGTACCTGAGGA ATACCCTCTAGCACCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGTTTCCACCGCGGTA ATACGGTTAGGGTGCAAGCGTTATCAGC GGAATTATTGGGCGACCTAAAGAGTCCG TAGGTCCGGTCATGCAAGTCTGCTGTCA AAGCCCACAGCTTACCGCGACTGCTGG ATCGGCGGTGGAAACTGCTTGTGACTTG AGTACGGTAGGGGTAGATCCCTG	*Synechococcus* sp.	*Synechococcus* sp.	Solido
10	CGTCAGGTTCGGCGGGGAGAGGCCTTT GGGTTGTAACTCCTTTTCTCAGGGAACA CACAACTGACGGCTACCTGAGGAATCAT CCTCGCCCCTGCTAACTCCGTGCTTTTC AGCAGCCGCGGTAATACGAGGAGGCAA GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG CGTTCGTAGGCGGCGTTTCAAGTCTGCT GTCAAAGGCCGAGGCTCAACTCCTCGG AAAGGCAGTGGAAACTGAAAAGCTAGAG GTCGGTAGGGGCAGA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido
11	TTCTGCCCCTACCGACCTCTAGCTTTTC AGTTTCCACTGCCTTTCCGAAGTTGAGC CTCGGCCTTTGACAGCAGACTTGAAACG CCGCCTACGAACGCTTTACGCCCAATAA TTCCGGATAACGCTTGCCTCCTCCGTAT TACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGC CGAGGCTGATTCCTCAGGTACCGTCAGT TCTTCTTCCCTGAGAAAAGGAGTTTACA ACCCAAAGGCCTCTCCCCCACGCGGC	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido
12	CTCAGCGTCAGGTTCGGCCCAGCAGAG CGCTTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAAT ATCTACGCATTTCACCGCTACACTGGGA ATTCCCTCTGCCCCTACCGACCTCTAGC TTTTCAGTTTCCACTGCCTTTCCGAAGTT GAGCCTCGGCCTTTGACAGCAGACTTGA AACGCCGCCTACGAACGCTTTACGCCCA ATAATTCCGGATAACGCTTGCCTCCTCC GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGT TAGCCGAGGCTGATTCCTCAGGTACCGT CAGTTCTTCTTCCCTGAGAAAAGGAGTT TACAACCCAA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido
13	CTCAGCGTCAGGTTCGGCCAGCAGAGC GCTTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATA TCTACGCATTTCACCGCTACACTGGGAA TTCCCTCTGCCCCTACCGACCTCTAGCT TTTCAGTTTCCACTGCCTTTCCGAAGTTG AGCCTCGGCCTGAGAAAAGGAGTTTACA ACCCAACCTACGAACGCTTTACGCCCAA TAATTCCGGATAACGCTTGCCTCCTCCG TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTA GCCGAGGCTG	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido

14	CTCAGCGTCAGGTCGGCCAGCAGAGCG CTTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATAT CTACCCTCCTCCGTATTACCGCGGCTGC TGGCACGGAGTTAGCCGAGGTCTGATT CCTCAGGTACCGTCAGTTCTTCTTCCCT GAGAAAAGGAGTTTACAACCCAATTGAA ACGCCGCCTACGAACGCTTTACGCCCAA TAATTCCGGATAACGCTTGCCTCCTCCG TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTA GCCGAGGCTG	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido
15	CCAGTGTAGCAGTGAGCTACAGGGGTA TCTAGAAGAACACCGGTCATGAGGAGTG CT	*Leptolynbya* sp. 2	Secuencia corta para blast	Líquido
16	TGCCTCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTG GCACGGAGTTAGCCGAGGCTGATTCCT CAGGTACCGTCGAAGTTCTTCTTCCCTG AGAAAAGGAGTTTACAACCCAA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido
17	CTCAGCGTCAGGTTCGTGGGGGAGAAG GCCTTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCA GGGAAGAAGAACTGACGGTACCTGAGG AATTCCCTCAGCCTCGGCTAACTCCGTG CTTTTCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG CGTAAAGCGTTCGTAGGCGGCGTTTCAA GTCTGCTGTCAAAGGCCGAGGCTCAACT CCTCGGAAAGGCAGTGGAAACTGAAAA GCTAGAGGTCGGTAGGGGCAGA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido
18	CAGCAGACTTGAAACGCCGCCTACGAA CGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAAC GCTTGCCTCCTCCGTATTACCGCGGCTG CTGGCACGGAGTTAGCCGAGGCTGATT CCTCAGGTACCGTCAGTTCTTCTTCCCT GAGAAAAGGAGTTTACAACCCA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido
19	GTTACAACCCAAAGGTCGGTAGGGGCA GAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTGGGA	*Leptolynbya* sp. 2	Secuencia corta para blast	Líquido
20	TAAACTTCCCTGGGAATTCCTTCTGTCC CTTCCGACCTCTAGCTTTTCAGTTTCCAC TGCCTTTCCGAAGTTGAGCCTCGGCCTT TGACAGCAGACTTGAAACGCCGCCTAC GAACGCTTTACGCCCAATAATTCCGGAT AACGCTTGCCTCCTCCGTATTACCGCGG CTGCTGGCACGGAGTTAGCCGAGGCTG ATTCCTCAGGTACCGTCAGTTCTTCTTC CCTGAGAAAAGGAGTTTACAACCCA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido

21	CTCAGCGTCAGGTTCGGCCCAGCAGAG CGCTTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAAT ATCTACGCATTTCACCGCTACACTGGGA ATTCCCTCTGCCCCTACCGACCTCTAGC TTTTCAGTTTCCACTGCCTTTCCGAAGTT GAGCCTCGGCCTTTGACAGCAGACTTGA AACGCCGCCTACGAACGCTTTACGCCCA ATAATTCCGGATAACGCTTGCCTCCTCC GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGT TAGCCGAGGCTGATTCCTCAGGTACCGT CAGTTCTTCTTCCCTGAGAAAAGGAGTT TACAACCCAA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido
22	CTCAGCGTCAGGTTCGGCCAGCAGAGC GCTTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATA TCTACGCATTTCACCGCTACACTGGGAA TTCCCTCTGCCCCTACCGACCTCTAGCT TTTCAGTTTCCACTGCCTTTCCGAAGTTG AGCCTCGGCCTTTGACAGCAGACTTGAA ACGCCGCCTACGAACGCTTTACGCCCAA TAATTCCGGATAACGCTTGCCTCCTCCG TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTA GCCGAGGCTGATTCCTCAGGTACCGTC AGTTCTTCTTCCCTGAGAAA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido
23	CCTCTAGCTTTTCAGTTTCCACTGCCTTT CCGAAGTTGAGCCTCGGCCTTTGACAG CAGACTTGAAACGCCGCCTACGAACGCT TTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTT GCCTCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTG GCACGGAGTTAGCCGAGGCTGATTCCT CAGGTACCGTCAGTTCTTCTTCCCTGAG AAA	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Solido
24	TATCTACGCATTTCACCGCTACACTGGG AATTCCCTCTGCCCCTACCGACCTCTAG CTTTTCAGTTTCCACTGCCTTTCCGAAGT TGATCCTTTTCTCAGGGAAGAAGAACTG AAACGGTACCTGAGGAAGCTCAGCCTC GGCTAACTCCGGATAATGCCAGCAGCC GCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCACGG AGTTATCCGGAATTATTGGGC	*Leptolynbya* sp. 2	*Leptolyngbya* cf. *valderiana*	Líquido
25	CCTGAGTGTCAGTTACGGCCAGTTGAGC GCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCCAATA TCTACGCATTTCACCGCTACACTGGGAA TTCCCTCAACCCCTACCGTACTCTAGCT TACCAGTTTCCACCGCTCTCCAGAAGTT AAGCTTCTGTCTTTAACAGCAGACTTGAT TAGCCACCTGCGGACGCTTTACGCCCAA TAATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCG TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTA GCCGATGCTTATTCTTAAAGTACCGTCA CTTTCTTCTTCCTTTATAAAAGAGGTTAC AACCCAA	*Stanieria* sp.	Cyanoprokariote no cultivada	Solido

Tabla 4. Secuencias de cepas aisladas y su identidad

3.4.2 Cinética de crecimiento

El crecimiento de *Synechococcus* sp. mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los medios nutritivos obteniendo un mayor crecimiento con ASNIII, CMM y BG11, con un área de colonización de 2,17 cm^2; 1,82 cm^2 y 1,69 cm^2 respectivamente. La figura 8 muestra el desarrollo de la población durante todo el ensayo, con fases de latencia de 12 días excepto para el medio nutritivo BG11 que fueron 8 días. Además, también se observó que en los medios BG11 no enriquecido con sal marina y ES no hubo crecimiento.

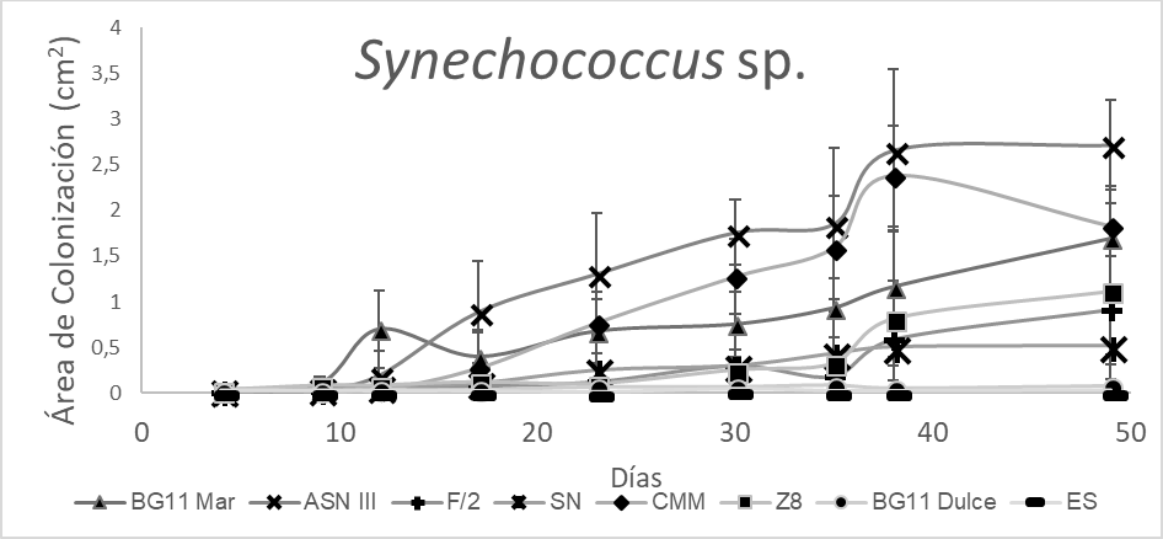

Figura 8. Curva de crecimiento de *Synechococcus* sp.

La figura 9 muestra que *Stanieria* sp. presenta una etapa de latencia de 30 días siendo un organismo de crecimiento lento, los medios nutritivos con mayor crecimiento fueron BG11 con un área de colonización de 1,35 cm^2 y ASNIII con 0,91 cm^2, no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos ($p < 0,05$). Al igual que en *Synechococcus* sp. BG11 sin sal marina y ES no se evidenció crecimiento.

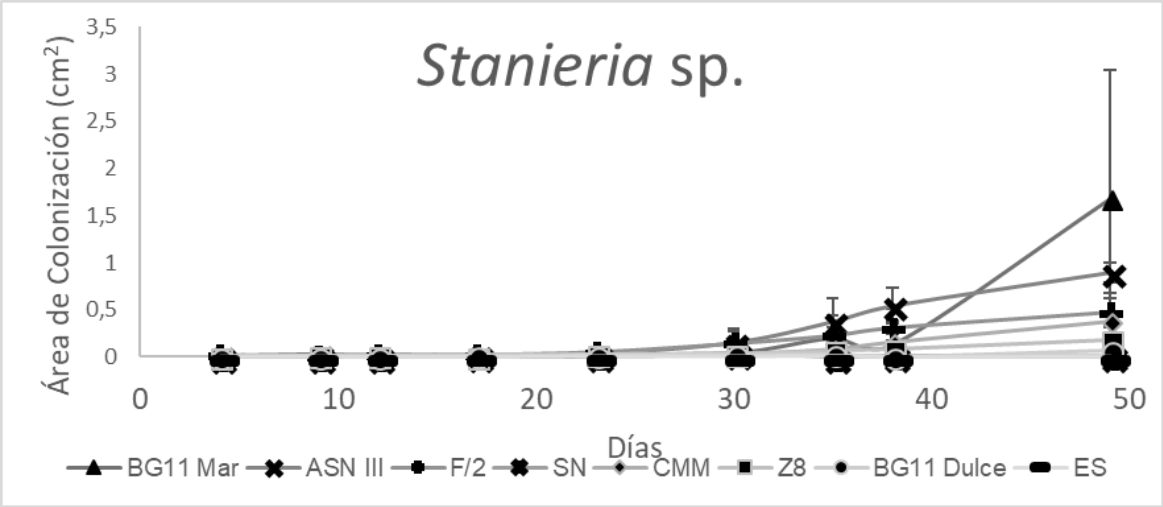

Figura 9. Curva de crecimiento de *Stanieria* sp.

En la cepa de *Leptolyngbya* sp. 1. A pesar de que no hubo muerte del organismo no se observó crecimiento en los diferentes tratamientos (figura 10), y muerte solo en BG11 agua dulce y ES.

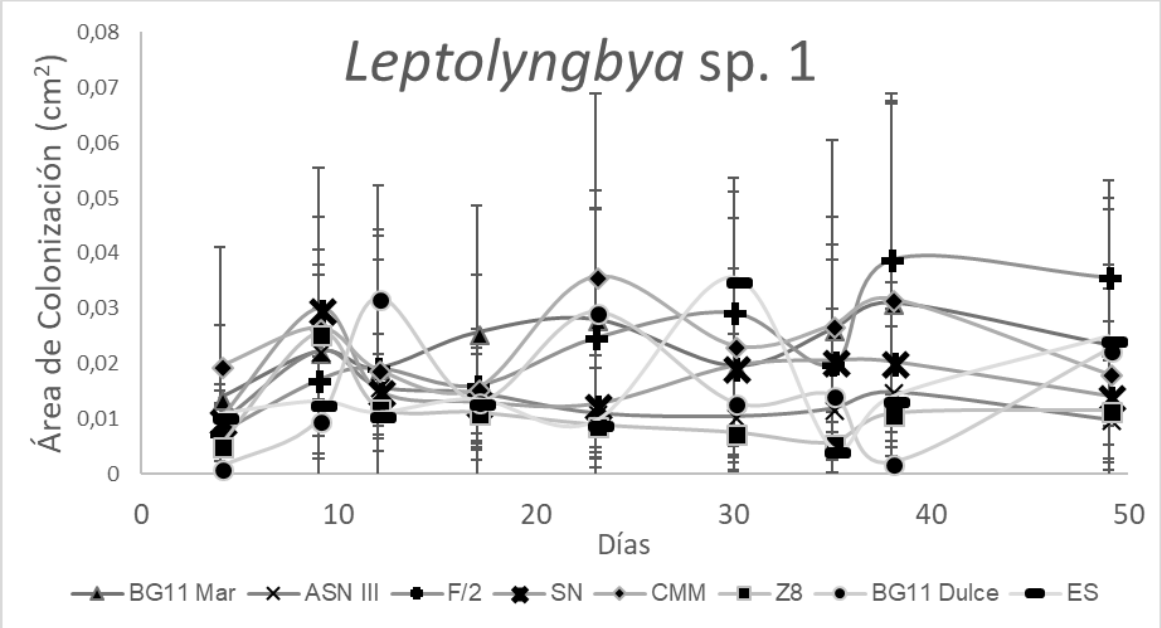

Figura 10. Curva de crecimiento de *Leptolyngbya* sp 1.

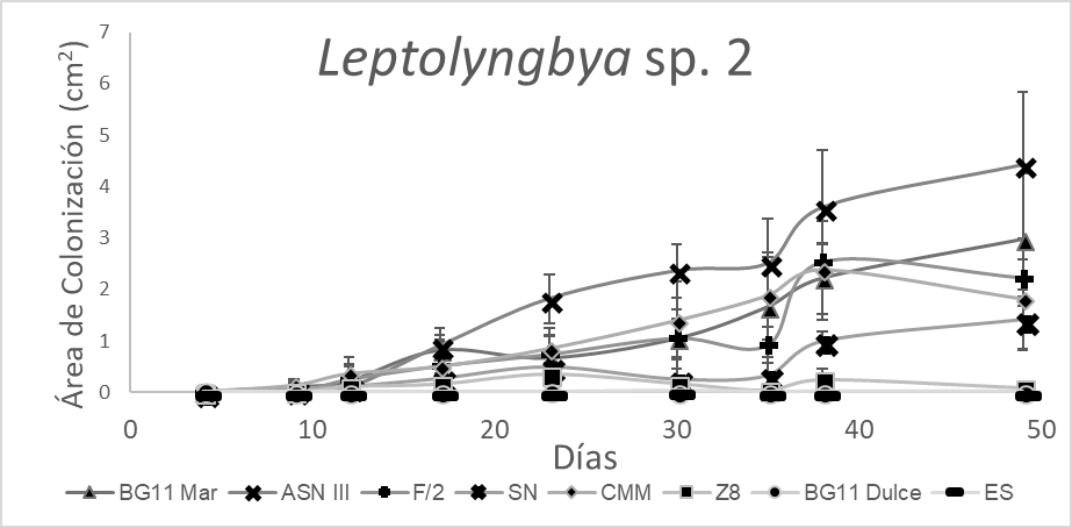

Figura 11. Curva de crecimiento de *Leptolyngbya* sp 2.

Letolyngbya sp 2 (figura 11) reveló un mayor crecimiento con los medios nutritivos ASNIII, BG11, con un área de colonización de 4,41 cm^2 y 2,96 cm^2, estadísticamente iguales con un $p < 0,05$. Así mismo, en *Letolyngbya* sp 3 (figura 12) se obtuvo un mayor crecimiento con los medios nutritivos SN, BG11 y CMM con un área de colonización de 1,99 cm^2; 1,62 cm^2 y 1,55 cm^2 respectivamente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre estos medios nutritivos. Se muestra el desarrollo de las poblaciones de *Letolyngbya* sp 2 y sp 3 durante todo el ensayo, con fases de latencia de 12 días.

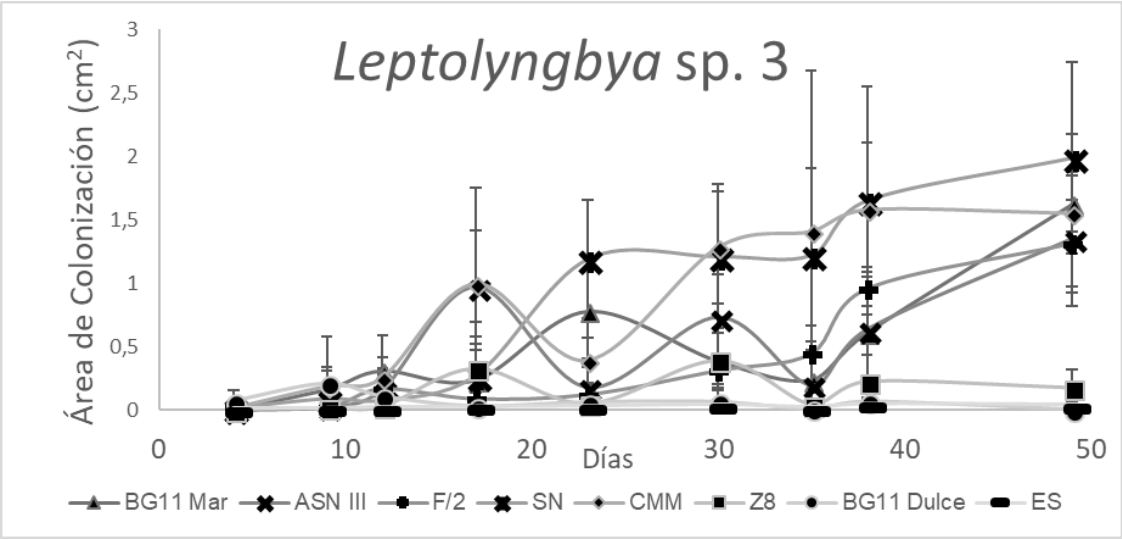

Figura 12. Curva de crecimiento de *Leptolyngbya* sp 3.

3.4.3 Índice de crecimiento

La figura 13 representa el índice de crecimiento con valores de cero a uno (0 – 1); donde señala que los valores cercanos a uno los cyanoprokariotes encontraron las mejores condiciones nutricionales para su crecimiento (medio nutritivo ideal para cada cepa). Este índice fue creado a partir de datos cualitativos (supervivencia y crecimiento, donde uno es positivo y cero es negativo) y cuantitativos (área de colonización final e intensidad de color).

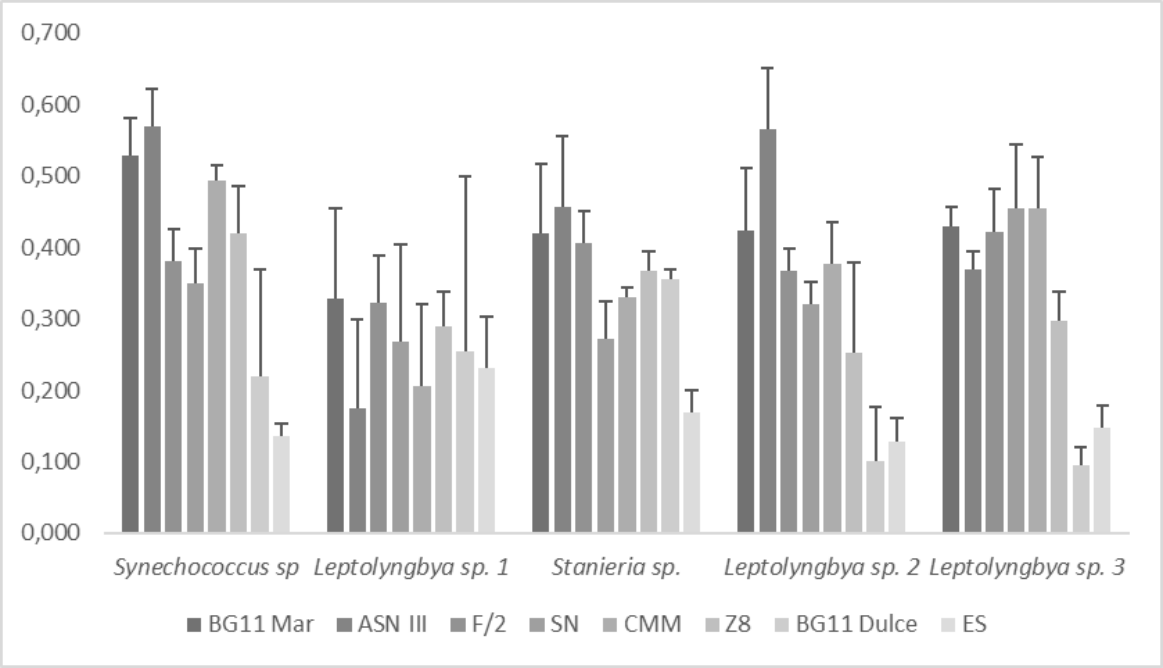

Figura 13. Índice de evaluación de crecimiento.

3.5 Discusión

El aislamiento de cyanoprokariotes en medio nutritivo solido presenta mayor éxito ya que de 13 cepas aisladas se obtuvieron 4 morfotipos diferentes en contraste con el medio nutritivo líquido que se obtuvo tan solo 1 morfotipo en las 12 cepas aisladas. Esto es debido a que el agar impide el crecimiento o reduce el número de contaminantes bacterianos asociados a estos organismos (Ferris & Hirsch 1991), por lo tanto, no hay competencia por los recursos. La relación que presenta estas comunidades bacterianas con las microalgas en general se ha estudiado por los efectos negativos como inhibición de crecimiento y producción de sustancias alguicidas, bactericidas y/o bacteriostáticas; Al igual que efectos

positivos en estimulación del crecimiento celular a través del aporte de vitaminas y fitohormonas en especial el ácido 3-indolacético (AIA) (Riquelme & Avendaño 2003; Gómez *et al*. 2012), siendo una de las posibles razones por la cual la cepa de *Stanieria* sp. presentó un crecimiento lento donde pasados 30 días del cultivo la población paso de fase de latencia a fase exponencial (figura 9) y *Leptolyngbya* sp. 1. aunque se mantuvo viva la cepa en todos los medios nutritivos excepto ES y BG11 dulce (figura 10).

La clasificación de los cyanoprokariotes con base en sus caracteres morfológicos, es una identificación compleja debido a que, teniendo la misma identidad genética, pueden cambiar su morfología por diversos factores ambientales o condiciones de cultivo (Anagnostidis y Komárek 1985, 1988; Moffitt *et al*. 2001; Rajaniemi *et al*. 2005). Los géneros *Planktolyngbya, Leptolyngbya, Geitlerinema y Limnothrix* son un problema en su determinación ya que presentan pocas características morfológicas distintivas entre ellas. Debido a estas pequeñas diferencias hasta el momento no ha sido posible establecer si se trata de genotipos diferentes o por el contrario es parte de la plasticidad fenotípica de cada cepa (Zwart *et al*. 2005).

El uso de herramientas moleculares para la identificación taxonómica a partir del gen ARNr 16s, tan solo permitió identificar 16 organismos a especie como *Leptolyngbya valderiana*, con un porcentaje de similitud ≥ 99 %. Para Komarek & Anagnostidis (2005), *Leptolyngbya valderiana* es una especie encontrada en ecosistemas dulceacuícolas, característica que no corresponde a los cyanoprokariotes estudiados; además, las pruebas con medios de cultivos mostraron que estos organismos no crecen en ausencia de sal (figuras 11 y 12). Sin embargo, Premanandh *et al*. (2009), evaluaron el nivel de genética de diferentes morfotipos de *Leptolyngbya valderiana* de la costa sur de India y Andaman (ecosistemas marinos). Este tipo de incongruencias son el resultado de los pocos estudios realizados en el neotrópico, y la carencia de expertos en taxonomía tradicional de este grupo. Para mejorar los resultados se debe ampliar el tamaño de la secuencia del gen cambiando el primer CYAN359F por CYAN106F (5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3') para tener un producto de 805pb (Zhen *et al*. 2017), utilizar genes específicos para cianobacterias como el reportado por Lee *et al*. (2014) ADN (rpoC), que contiene un componente central único que está ausente en las de más eubacterias o rpoC1, que corresponde a la región espaciadora intergénica de la ficocianina (cpcBA-IGS) (Seo & Yokota 2003; Kumari *et*

al. 2009). Sin embargo, como lo menciona Corrales *et al*. (2017) la base de datos del Genbank carece de secuencias para estos genes.

Los medios de cultivo proveen los requerimientos necesarios para el crecimiento de los cyanoprokariotes, tales como nitrógeno, fosforo (macronutrientes) y sales minerales (micronutrientes), un pH adecuado y en algunos casos vitaminas y hormonas (Gonzáles *et al*. 1995). En este caso tenemos que ES no es un medio nutritivo adecuado para el crecimiento de cyanoprokariotes marinos de Providencia y Santa Catalina Islas – Colombia en laboratorio, teniendo en cuenta que para Andersen (2005) este es un medio selectivo para los organismos de estudio por ser los únicos que poseen las enzimas necesarias que degradan Na_2 β-glicerofosfato para el aprovechamiento del fosforo. En BG11 en agua dulce no se presentó crecimiento ninguna de las cinco cepas evaluadas, aunque tenemos estudios como el de Rosales *et al*. (2005) donde cultivaron una cepa de *Synechococcus* sp. aislada de un ecosistema hipersalino a diferentes concentraciones de NaCl (de 0% a 100%) presentando crecimiento en todos los medios. El medio Z8 difiere de la mayoría porque contiene metales poco usados como Vanadio, Wolframio, Cadmio. Ya para los demás medios se presentan algunos cambios en el tipo de asociación de los metales ya sea con sulfatos o cloruros. ASNIII presenta la mayor concentración de Cloro (33,1 mM) y Magnesio (24 mM) respecto a BG11 (0,49 mM en Cl y 0,31 mM en Mg). Estos elementos son importantes para mantener la presión osmótica y el equilibrio iónico, los encontramos en gran cantidad en el agua de mar. Además, el magnesio es el ion central que aparece en el núcleo de porfirina de las clorofilas (Andersen 2005). El contenido de vitaminas varía de acuerdo con el medio, donde ES, F/2 y CMM contienen vitamina B12 (siendo F/2 un medio específico para microalgas marinas), cianocobalamina y biotina, ASNIII y SN tan solo contienen vitamina B12. Y de gran interés la ausencia de vitaminas en los medios BG11 y Z8 siendo estos los más utilizados en el cultivo de cyanoprokariotes.

El aumento de biomasa de cyanoprokariotes en los ecosistemas marinos está relacionada con la eutrofización (Kuffner & Paul 2001; Paerl *et al*. 2008; Arthur *et al*. 2009; Rossi *et al*. 1997). Estudios de Burja *et al*. (2002); Ladakis *et a*l. (2006) aseguran que el aumento de la concentración de nitrógeno en cultivo desarrollados en laboratorio, están relacionados con el aumento de biomasa. Siendo esto un principio fundamental para el cultivo de estos organismos. De tal manera que, BG11 presenta la mayor concentración de nitrógeno (17,63 mM) seguido por SN y ASNIII (9,02 y 8,82 mM respectivamente), Z8 (5,98 mM) y

CMM (6,03 mM) con tan solo una tercera parte de la concentración del BG11 seguidos por ES con 1,66 mM y F/2 con 0,88 mM, Al igual Redfield (1958) indica la importancia del fosforo y la relación que existe en ecosistemas marinos con el nitrógeno [16N:1P]. Relación que ninguno de los medios nutritivos usados en el estudio cumple, (ASNII [2,6:1]; F/2 [24,3:1]; Z8 [33,6:1] ES [36:1]; BG11 [100,7:1]; CMM [367,9:1]) y de acuerdo a los resultados de crecimiento para *Synechococcus* sp , *Leptolyngbya* sp 2 y *Stanieria* sp. (fig. 8), esta premisa no se ve reflejada, donde ASNIII y BG11 presentaron los mejores resultados siendo dos medios nutritivos que comparten el mismo contenido y concentración de micronutrientes (metales traza) (tabla 3), y contrastan drásticamente en los macronutrientes. ASNIII con concentraciones mayores de Fosforo (3,29 mM), Magnesio (24 mM) y Cloro (33,1 mM) respecto a BG11 (P [0,17 mM]; Mg [0,31 mM]; Cl [0,49 mM]).

Las metodologías comúnmente utilizadas para la evaluación del crecimiento en función del tiempo de la población en cultivos monoalgales son directas, como conteo de organismos en cámaras de Neübauer, Sedgewick Rafter, entre otras; y peso seco, un método destructivo que requiere gran cantidad de réplicas; e indirectas como densidad óptica por espectrofotometría a partir de absorbancia en determinada longitud de onda (Arredondo *et al*. 2017). Sin embargo, para especies que crecen formando biopelículas o aglomerados (no se distribuyen de manera homogénea en el medio de cultivo líquido), como *Leptolyngbya* y especies del orden Oscillatoriales (Komarek. & Anagnostidis 2005), estas técnicas no funcionan de manera adecuada. Por tal motivo, se sugiere una nueva metodología para la evaluación de la cinética de crecimiento a partir de imágenes (ver sección materiales y métodos), siendo un método de medición directa, no destructivo y que evalúa la población completa que se ha sembrado en el cultivo con medio sólido. El índice de evaluación de crecimiento presenta que *Synechococcus* sp. crece de manera más eficiente en ASNIII con un valor de 0,57 y en BG11 con 0,52, estadísticamente los dos medios no presentan diferencias significativas con un $P < 0,05$.

El índice de evaluación de crecimiento (fig. 8) presenta que *Synechococcus* sp., *Stanieria* sp. y *Leptolyngbya* sp 2., crecen de manera eficiente en ASNIII con valores de 0,57; 0,45 y 0,56 seguido de BG11 con 0,52; 0,42 y 0,42 respectivamente. Estadísticamente estos dos tratamientos no presentan diferencias significativas con un $P < 0,05$ (ver anexo 1). No obstante, las curvas de crecimiento indican

que ASNIII presenta las mejores condiciones para el crecimiento de*Synechococcus* sp. y *Leptolyngbya* sp 2 (ver fig. 4 y 7); y BG11 para *Stanieria* sp. (ver fig. 5). *Synechococcus* y *Leptolyngbya* son organismos cosmopolitas que presentan alta plasticidad fisiológica, para la incorporación de nutrientes con capacidad de crecimiento en condiciones limitantes de nutrientes con su tasa de crecimiento mayores en comparación con otros cyanoprokariotes y dominancia cuando se encuentra en consorcio con otros organismos fotoautótrofos especialmente *Leptolyngbya* (Partensky *et al*., 1996; Moore *et al*., 2002; Ting *et al*., 2002; Scanlan, 2003; Johnson *et al*., 2006; Casey *et al*., 2007; Buitenhuis *et al*., 2012). Por su parte, *Stanieria* de acuerdo con Komarek. & Anagnostidis (1998) es un género con 5 especies, característicamente epifito de otros cyanoprokariotes filamentosos, con escasos estudios fisiológicos. Por último, *Leptolyngbya* sp 3 no presentó diferencias significativas de acuerdo con índice de crecimiento (fig. 8) entre los medios nutritivos BG11, ASNIII, F/2, SN, CMM y Z8 (fig 7) con valores de 0,43; 0,36; 0,42; 0,45; 0,45 y 0,29. con mejores resultados en SN en el crecimiento (área de colonización 1,99 cm^2) como se observa en la figura 7. Es aquí, donde vemos como células de *Leptolyngbya* sp. 3 ingresan al medio intracelular de manera más eficiente las diferentes fuentes de nutrientes inorgánicas ofrecidas por cada uno de los medios de cultivo, a diferencia de *Leptolyngbya* sp. 2.

3.6 Conclusiones

El crecimiento de cada cepa está dado a partir del medio nutritivo que supla todas sus necesidades nutricionales, lo que hace una especificidad entre cada cepa y un medio cultivo, con lo cual, ASNIII y BG11 enriquecido con 25 g / l de sal marina presentan las mejores condiciones para el crecimiento de cyanoprokariotas bentónicas de Providencia y Santa Catalina Islas - Colombia

Los organismos descritos en este trabajo constituyen un acercamiento a la diversidad de cyanoprokariotes cultivables del Caribe colombiano.

El análisis de crecimiento en cyanoprokariotes cultivados en medio nutritivo solido a partir de imágenes es una nueva herramienta alternativa para el estudio de aquellos organismos que crecen formando aglomeraciones, mats, clusters o biofilms.

3.7 Bibliografía

Alcaldía de Providencia y Santa Catalina Islas - San Andrés. 2016. Página web: http://providencia-sanandres.gov.co/informacion_general.shtml. Consultado: 20 de septiembre de 2016.

Anagnostidis K & Komárek J. 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes". 1-Introduction. Archiv für Hydrobiologie - Supplement, 71: 1-2.

Anagnostidis K & Komárek J. 1988. "Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3- Oscillatoriales". Archiv für Hydrobiologie. 80: 1-4.

Andersen R. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Arredondo B, Voltolina D, Zenteno T, Montoya M & Gómez G. 2017. Métodos y herramientas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. Segunda Edición.

Arthur K, Paul V, Paerl H, O'Neil J, Joyner J, Meickle T. 2009. Effects of nutrient enrichment of the cyanobacterium *Lyngbya* sp. on growth, secondary metabolite concentration and feeding by the specialist grazer *Stylocheilus striatus*. Marine Ecology Progress Series, 394: 101–110.

Buitenhuis E, Li W, Vaulot D, Lomas M, Landry M, Partensky F, Karl D, Ulloa O, Campbell L, Jacquet S, Lantoine F, Chavez F, Macias D, Gosselin M & McManus G. 2012. Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. Earth System Science Data Discussions 5: 221-242.

Burja A, Abou-Mansour E, Banaigs B, Payri C, Burgess J, Wright P. 2002. Culture of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae), for bioprocess intensified production of cyclic and linear lipopeptides. Journal of Microbiological Methods, 48: 207-219.

Casey J, Lomas M, Mandecki J & Walker D. 2007. *Prochlorococcus* contributes to new production in the Sargasso Sea deep chlorophyll maximum. Geophysical Research Letters 34: L10604.

Corrales M, Villalobos K, Rodríguez A, Muñoz N & Umaña R. 2017. Identificación y caracterización molecular de cianobacterias tropicales de los géneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Scytonema* (Nostocales: Nostocaceae), con posible potencial biotecnológico. UNED Research Journal. 9(2): 280-288.

Engene N, Choi H, Esquenazi E, Rottacker E, Ellisman M, Dorrestein P, Gerwick W. 2011. Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived rich secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus *Lyngbya*. Environmental Microbiology, 13: 1601-1610.

Engene N, Coates R, Gerwick W. 2010. 16s rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya*. Journal of Phycology, 6: 591-601.

Engene N, Gunasekera S, Gerwick W, Paul V. 2013a. Phylogenetic inferences reveal a large extent of novel biodiversity in chemically rich tropical marine cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 79: 1882-1888.

Engene N, Paul V, Byrum T, Gerwick W, Thor A, Ellisman M. 2013b. Five chemically rich species of tropical marine cyanobacteria of the genus *Okeania* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanoprokaryota). Journal of Phycology, 49: 1095-1106.

Engene N, Rottacker E, Kastovsky J, Byrum T, Choi H, Ellisman M, Komarek J, Gerwick W. 2012. *Moorea producens* gen. nov, sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov, tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62: 1171- 1178.

Ferris M & Hirsch C. 1991. Method for isolation and purification of cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 57(5): 1448 - 1452.

Fuenmayor G, Jonte L, Rosales N & Morales E. 2009. Efecto de la salinidad y la concentración de nutrientes sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria autóctona *Oscillatoria* sp. MOF-06. CIENCIA 17(1): 50 – 57. Maracaibo, Venezuela.

Galhano V, De Figueiredo D, Alves A, Correia A, Pereira M, Gomes J & Peixoto F. 2011. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. Hydrobiología, 663(1), 187-203. Doi:10.1007/s10750-010-0572-5.

González, M, Parra O & Cifuentes A. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción. Chile: Editora Aníbal Pinto, 220-249

Gómez L, Valero N & Morales E. 2012. Bacterias halotolerantes/alcalofilas productoras de ácido indol acético (AIA) asociadas a *Arthrospira platensis* (Cyanophyceae). Revista Colombiana de Biotecnología, 14(2), 81-88.

Google Earth. (s.f.). [Mapa de Providencia y Santa Catalina Islas, Colombia en Google earth]. Recuperado el 20 de diciembre de 2017.

Hassler C. & Twiss M. 2006. Bioavailability of iron sensed by a phytoplanktonic Fe-bioreporter. Environmental Science & Technology 40:2544-2551.

Johnson Z. Zinser E, Coe A, Mcnulty N, Woodward E & Chisholm S. 2006. Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. Science 311: 1737-1740.

Komárek J. & Anagnostidis K. 1998. Cyanoprokaryota I. Teil: Chroococcales. - In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (Eds): Süsswasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer, Jena Stuttgart-Lübeck-Ulm.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota II. Teil Oscillatoriales. Jena, Alemania: Elsevier/Spektrum Gmbh

Komárek, J. & Anagnostidis K. 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophyta. 4. Nostocales. Arch. Hydrobiol.

Komárek J, Kaštovský J, Mareš J & Johansen J. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia 86: 295–335.

Kuffner I, Paul V. 2001. Effects of nitrate, phosphate and iron on the growth of macroalgae and benthic cyanobacteria from Cocos lagoon, Guam. Marine Ecology Progress Series, 222: 63-72.

Kumari N, Srivastava A & Bhargava P. 2009. Molecular approaches towards assessment of cyanobacterial biodiversity. African Journal of Biotechnology. 8(18): 4284-4298.

Ladakis M, Dassenakis M, Pantazidou A. 2006. Nitrogen and phosphorus in coastal sediments covered by cyanobacteria mats. J Soils Sediment, 6: 46-54.

Moffitt M, Blackburn S & Neilan B. 2001. rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 505-512.

Moore L, Post A, Rocap G & Chisholm S. 2002. Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. Limnology and Oceanography 47: 989-996.

Muñoz N. 2012. Cianobacterias bentónicas marinas en el Caribe Central y sur de Costa Rica. Revistas Ciencias Marinas y Costeras. Vol. 5> 57/ 67.

Nübel U, Garcia F & Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 63, 3327–3332

Paerl H, Joyner J, Joyner A, Arthur K, Paul V, O'Neil J, Heil C. 2008. Co-occurrence of dinoflagellate and cyanobacterial harmful algal blooms in southwest Florida coastal waters: Dual nutrient (N and P) input controls. Marine Ecology Progress Series, 371: 143–153.

Partensky F, Blanchot J, Lantoine F, Neveux J & Marie D. 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. Deep-Sea Research 43: 1191–1213.

Premanandh J, Priya B, Prabaharan D & Uma L. 2009. Genetic heterogeneity of the marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* (Pseudanabaenaceae) evidenced by RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. Journal of Plankton Research. 31(10):1141 – 1150.

Rajaniemi P, Hrouzek P, Kaštovská K, Willame R, Rantala A, Hoffmann L, Komárek J & Sivonen K. 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 11-26.

Redfield A. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. American Scientist. 46: 205–221.

Riquelme C & Avendaño R. 2003. Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture. Revista Chilena de Historia Natural. 76: 725-736

Rosales N, Guevara M, Lodeiros C & Morales E. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. Revista de Biología Tropical. Vol. 56 (2): 421- 429.

Rosales N, Ortega J, Mora R & Morales E. 2005. Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Ciencias Marinas. 31(2): 349–355.

Rossi J, Roberts M, Yoo H, Gerwick W. 1997. Pilot scale culture of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* for its pharmaceutically-useful natural metabolite curacin A. J Appl Phycol, 9: 195-204.

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

Scanlan J. 2003. Physiological diversity and niche adaptations in marine *Synechococcus* Advances in Microbial Physiology 47: 1-64.

Schindelin J, Arganda I. & Frise E. 2012, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", Nature methods 9(7): 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019.

Seo P & Yokota A. 2003. The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, gyrB, rpoC1 and rpoD1 gene sequences. The Journal of general and applied microbiology. 49(3): 191-203.

Singh S. Pathak J. & Sinha R. 2017. Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 69.

Sunda W, Price N. & Morel F. 2005. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. 35-63 p. En: Andersen R (ed) Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press. Amsterdam, Alemania. 589 pp.

Thacker R & Paul V. 2004. Morphological, chemical, and genetic diversity of tropical marine cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (Oscillatoriales). Applied and Environmental Microbiology, 70: 3305-3312.

Ting C, Rocap G, King J & Chisholm S. 2002. Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. Trends in Microbiology 10: 134-142.

Valencia H. 2004. Manual de prácticas de microbiología básica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología, Bogotá, Colombia.

Wehr J, Sheath R y Kociolek J. 2002. Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification. 1st Edition. Academic Press.

Whitton B & Potts M. 2000. The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space. Springer Netherlands. Edición 1.

Zhen Z., Liu J, Rensing C, Yan C & Zhang Y. 2017. Effects of two different high-fidelity DNA polymerases on genetic analysis of the cyanobacterial community structure in a subtropical deep freshwater reservoir. Archives of Microbiology.199(1): 125-134.

4. Producción de biomasa y pigmentos de los cyanoprokariotes marinos *Synechococcus* sp. (Synechococcales), *Stanieria* sp. (Pleurocapsales) y *Leptolyngbya* sp. (Synechococcales) en función de la irradiancia.

4.1 Resumen

La producción masiva de cyanoprokariotes está limitada por diversos factores ambientales como disposición de nutrientes, intensidad de luz (irradiancia) y fotoperiodo, afectando directamente el contenido de clorofila *a*, carotenos, ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina. En este estudio, se manipulo las variables de fotoperiodo (12:12; 14:10 y 16:8 horas días: horas oscuridad) e intensidad de luz (18,5; 55,5 y 111 µmol*m^{-2}*s^{-1}) en cultivos discontinuos de 250 ml de *Synechococcus* sp. (cepa 1) y *Leptolyngbya* sp 3 (cepa 3) (ver tabla 4) durante 15 días y *Stanieria* sp. (cepa 7) (tabla 4) por 30 días. Cada tratamiento con 6 réplicas. Se evaluó la producción de biomasa en peso seco (g), pigmentos fotosintéticos (mg / l) y ficobiliproteínas (mg / ml). La mayor biomasa de *Synechococcus* sp. y *Leptolyngbya* sp 3 fue obtenida en la irradiancia de 111 µmol*m^{-2}*s^{-1} y fotoperiodo 16:8. Contrario para *Stanieria* sp. (18,5 µmol*m^{-2}*s^{-1} y 12:12). La concentración de pigmentos fotosintéticos fue variable en cada cepa, destacando a *Stanieria* sp por el contenido en clorofila *a* (4,93 mg / l) y ficoeritrina (4,6 µg / ml); *Synechococcus* sp. por carotenos (2,49 mg / l) y *Leptolyngbya* sp 3. por ficocianina (50,8 µg / ml) y aloficocianina (33,3 µg / ml).

Palabras clave: cianobacterias, clorofila, carotenos, ficobiliproteínas, Caribe.

Abstract

The mass production of cyanoprokariotes is limited by various environmental factors such as nutrient disposal, light intensity (irradiance) and photoperiod, directly affecting the content of chlorophyll *a*, carotenes, phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin. In this study, the photoperiod variables were used (12:12, 14:10 and 16: 8 hours days: dark hours) and light intensity (18.5, 55.5 and 111 µmol * m-2 * s- 1) in discontinuous cultures of 250 ml of Synechococcus sp. (strain 1) and Leptolyngbya sp 3 (strain 3) (see table 4) for 15 days and Stanieria sp. (strain 7) (table 4) for 30 days. Each treatment with 6 replicas. The production of biomass in dry weight (g), photosynthetic pigments (mg / l) and phycobiliproteins (mg / ml) was evaluated. The largest biomass of Synechococcus sp. and Leptolyngbya sp 3 was obtained in the irradiance of 111 µmol * m-2 * s-1 and photoperiod 16: 8. Contrary to Stanieria sp. (18.5 µmol * m-2 * s-1 and 12:12). The concentration of photosynthetic pigments was variable in each strain, highlighting Stanieria sp for the content of chlorophyll a (4.93 mg / l) and phycoerythrin (4.6 µg / ml); Synechococcus sp. by carotenes (2.49 mg / l) and Leptolyngbya sp. 3. by phycocyanin (50.8 µg / ml) and allophycocyanin (33.3 µg / ml).

Key words: cyanobacteria, chlorophyll, carotenes, phycobiliproteins, Caribbean.

4.2 Introducción

Los cyanoprokariotes son un grupo de microorganismos autótrofos con capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica (Whitton & Potts 2000), sintetizar clorofila *a* y pigmentos ficobilinicos (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) (Cronberg & Anadotetter 2006; Lee 1999). El cultivo de estos organismos ha sido estudiado de gran manera en biotecnología, por su eficiencia en la producción de compuestos orgánicos (lípidos, proteínas, pigmentos carbohidratos y compuestos biológicamente activos como las toxinas). Al igual, tiene potencial en la producción de energía a partir de los residuos celulares convirtiéndose en metano o alcohol (Paniagua 1994; Shivaun *et al*., 1997; Viera Costa *et al*., 2004; Yim *et al*., 2004). Sin embargo, al ser organismos fotosintéticos, la disponibilidad de luz (Mundt *et al*. 2001) y el fotoperiodo son considerados dos factores importantes que limitan la productividad en términos de biomasa (Richmond, 1990), siendo de gran interés el optimizar en condiciones de laboratorio los cultivos en función, la irradiancia y el fotoperiodo (Hoffmann 1988), sin dejar de lado a la concentración de macro y micronutrientes (ver capítulo 2).

La estimación de peso seco algal es una medida directa para determinar la producción de biomasa en el cultivo de cyanoprokariotes, No obstante, este método puede llevar a errores en las mediciones para el caso de organismos marinos debido a que al momento de filtrar o recuperar la biomasa esta contiene solidos suspendidos como sales en el medio nutritivo, en los espacios intercelulares y en la superficie celular (Zhu & Lee 1997). Para lo cual, diversos autores como Sorokin (1973), López *et al*. (1993), Henderson *et* al. (1988), Spriharan *et al*. (1991), Craigie *et al*. (1992), Molina *et al*. (1994) y Vonshak (1997), sugieren para remover estos residuos, realizar lavados con formato de amonio, Cloruro de sodio, una mezcla de estos dos compuestos, medio nutritivo preparado con agua destilada, solo agua destilada, ácido clorhídrico [0,5 N], y agua acidificada respectivamente.

La clorofila *a* y los carotenos son pigmentos fotosintéticos lipídicos unidos a proteínas mediante enlaces sencillos y dobles alternados, relacionados con la capacidad de emplear la luz para realizar las reacciones químicas (Albertano *et al*. 2000). Los cyanoprokariotes, además, tienen una capacidad de adaptación cromática a diferentes longitudes de onda importante para la productividad primaria y la supervivencia. Las ficobiliproteínas juegan

un papel importante en esta característica, ya que, son la que permiten aprovechar en un rango más amplio el espectro de luz que otros microorganismos fotosintéticos (Kehoe, 2010). De hecho, los cambios en la proporción de ficobiliproteínas hacen que puedan adaptarse a los cambios de calidad y cantidad de luz que se producen en el medio natural (Simeunović *et al*. 2013).

Estos organismos además de la gran importancia que tienen sus metabolitos secundarios en la actualidad, los pigmentos tanto clorofilas y carotenos como ficobiliproteínas también están siendo utilizados por el hombre en la industria cosmética y alimentaria como colorantes naturales, en la industria farmacéutica por las propiedades que algunos estos tienen como antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, estimulante del sistema inmune, etc. (Richmond 1990; Henrikson 1989). Esta línea de investigación es nueva para Colombia y que en el mundo representa una de las fronteras del conocimiento que podrían dar paso a procesos que permitirían el desarrollo de la industria nacional de base biotecnológica. Es por esto, que el trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la irradiancia y el fotoperiodo sobre el crecimiento en términos biomasa, contenido de clorofila a, carotenos y ficobiliproteínas, de los cyanoprokariortes *Synechococcus* sp. (cepa 1), *Stanieria* sp. (cepa 7) y *Leptolyngbya* sp 3 (cepa 3) (ver tabla 4) en cultivos discontinuos.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Condiciones de cultivo

Los cyanoprokariotes utilizados en este trabajo son *Synechococcus* sp. (cepa 1), *Stanieria* sp. (cepa 7) y *Leptolyngbya* sp 3 (cepa 3) (ver tabla 4) que fueron aisladas de Providencia y Santa Catalina Islas – Colombia en dos localidades, Felipe´s Place, ubicada al nor-occidente de la isla de Providencia (13° 22’ 50,273” Norte; 81° 22’ 29,612” Oeste) y en el costado suroriental de la isla Santa Catalina, (13° 22’ 52,407” Norte; 81° 23’ 31,719” Oeste). Este ecosistema pertenece a la Reserva de Biósfera Seaflower designada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) en el año 2000 (Sánchez 2012).

Las pruebas de cultivo se realizaron con agua destilada y desionizada enriquecida con sal marina 25 g / l y medio nutritivo ASNIII (Andersen 2005) para *Synechococcus* sp. y

Leptolyngbya sp. 3 conformado por ácido cítrico [1,56*10^{-5} M], citrato de hierro amonio [9*10^{-6} M], $NaNO_3$ [8,82*10^{-3} M], $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ [3,29*10^{-3} M], $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [1,42*10^{-2} M], $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ [3,4*10^{-3} M], Na_2CO_3 [2,41*10^{-4} M], $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ [9,84*10^{-3} M], KCl [6,71*10^{-3} M], Mg –EDTA [1,59*10^{-6} M]. Para *Stanieria* sp. se usó BG11 (Andersen 2005) con Ácido cítrico [3,12*10^{-5}], Citrato de hierro amonio [3*10^{-5}], $NaNO_3$ [1,76*10^{-2}], $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ [1,75*10^{-4}], $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [3,04*10^{-4}], $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ [2,45*10^{-4}], Na_2CO_3 [1,89*10^{-4}] y Mg - $Na_2EDTA \cdot H2O$ [8,37* 10^{-6}]. El contenido de micronutrientes (metales traza) es igual para para los dos medios nutritivos, H_3BO_3 [4,6*10^{-5} M], $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [9,14*10^{-6} M], $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ [7,72*10^{-7} M], $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ [3,16*10^{-7} M], $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ [1,61*10^{-3} M], $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ [1,7*10^{-7} M]. Finalmente, solo ASNIII contiene vitamina cianocobalamina (vitamina B12) [7,39*10^{-9} M].

Los cultivos se realizaron en botellas de vidrio de 375 ml con 250 ml de medio nutritivo. Se utilizó un inóculo de biomasa fresca para *Synechococcus* sp. de 0,03 g, *Stanieria* sp. 0,015 g y *Leptolyngbya* sp. 3 con 1 g (quedando a una concentración en el medio líquido de 0,0075 g / l; 0,00375 g / l y 0,25 g / l respectivamente). Se mantuvieron a una temperatura de 23 ± 2 °C y aireación constante (4 ml de aire / s). Se evaluó la producción de biomasa en peso seco y pigmentos (clorofilas y ficobiliproteínas) en cada una de las cepas a partir de la combinatoria de 3 variables de intensidad de luz (18,5; 55,5 y 111 µmol*m^{-2}*s^{-1}) y 3 de fotoperiodo (12:12; 14;10 y 16:8 horas días: horas oscuridad). Teniendo 9 tratamientos enumerados como se muestra en la tabla 5. Cada uno de los tratamientos con 6 réplicas.

Fotoperiodo (h luz : h oscuridad)	**Irradiancia (µmol*m^{-2}*s^{-1})**		
	18,5 µmol*m^{-2}*s^{-1}	**55,5 µmol*m^{-2}*s^{-1}**	**111 µmol*m^{-2}*s^{-1}**
12:12	1	4	7
14:10	2	5	8
16:08	3	6	9

Tabla 5. Numero de tratamientos según combinatoria de variables.

4.3.2 Peso seco

El peso seco se determinó al final de cada experimento. Los cultivos de *Synechococcus* sp. y *Leptolyngbya* sp. 3 tuvieron una duración de 15 días y *Stanieria* sp. 30 días (tiempo

establecido por resultados anteriores, capitulo 2). Al finalizar la etapa de cultivo se filtró la biomasa, y se lavó con agua destilada y desionizada tres veces para eliminar los residuos de sal, se congelo a -80 °C y se liofilizó. Después de liofilizadas se pesó en balanza analítica y se dispuso la biomasa en viales de vidrio de 5 ml de volumen con tapa a presión, para posteriores análisis bioquímicos.

4.3.3 Extracción de clorofilas y carotenos

La concentración de clorofila y carotenos fue determinada a través de la metodología descrita por Melgarejo (2010), Azov (1982), Jeffrey & Humphrey (1975) y Arredondo *et al*. (2017) con algunas modificaciones, utilizando metano puro como solvente de extracción. Se pesó 0,01 g de biomasa seca liofilizada en tubos falcón de 15 ml, se adicionó 6 ml de metanol y perlas de sílice para asegurar el rompimiento celular, se pasó por vortex a máxima velocidad 5 minutos, se colocó al baño Maria a 70 °C tres minutos y se procedió a centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos. Luego se midió la absorbancia a 750 nm (turbidez), 665 nm (clorofila a) y 480 nm (carotenos).

4.3.4 Extracción de ficobiliproteínas

La extracción y medición de ficobiliproteínas se realizó con buffer de fosfato de potasio [100 mM] pH 7,5; EDTA – Na_2 [1 mM] compuestos por KH_2PO_4; $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$; EDTA - Na_2 y H_2O destilada y desionizada, conforme a Melgarejo (2010), Arredondo *et ál*. (1997) y Bennett & Bogard (1973). Se pesó 0,01 g de biomasa seca (previamente liofilizada) en tubos falcón de 15 ml, en oscuridad se adicionó 6 ml de buffer de fosfato y perlas de sílice para asegurar el rompimiento celular, se pasó por vortex a máxima velocidad 5 minutos, se congeló a -4 °C durante 24 h y se procedió a centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos. Luego se midió la absorbancia a 750 nm (para restar turbidez), 565 nm, 620 nm y 650 nm para ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina respectivamente.

4.3.5 Análisis estadístico

Para cada especie se realizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de 3 x 3, para un total de 9 tratamiento, con 6 réplicas por tratamiento.

El análisis estadístico se realizó primeros verificando los supuestos de aleatoriedad con las pruebas corridas arriba y abajo de la mediana; corridas arriba y abajo; prueba de Box-

Pierce, normalidad con las pruebas de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov; y homogeneidad de varianzas con la prueba de Barlett. Para comparar los distintos tratamientos realizó análisis de varianza (ANOVA) a una vía y prueba de Kruskal-Wallis con nivel de significancia de 0,05 seguidos por pruebas de comparación de Tukey para establecer los tratamientos causantes de las diferencias estadísticas.

4.4 Resultados

Estadísticamente y con una confianza del 95 % los datos de biomasa en peso seco, concentración de clorofilas y ficobiliproteínas totales cumplen los supuestos de aleatoriedad, normalidad y homogeneidad de varianzas. Además, el análisis de varianza ANOVA indica con un $p < 0,05$ que hay diferencias significativas entre tratamientos (ver anexo B).

4.4.1 *Synechococcus* sp.

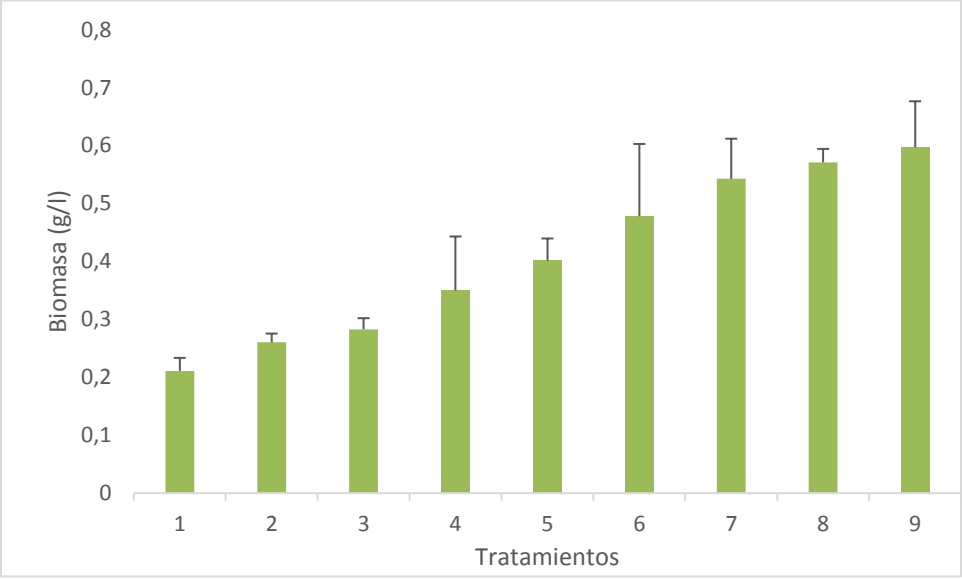

Figura 14. Producción de biomasa en cultivo de 15 días de *Synechococcus* sp.

La producción de biomasa en *Synechococcus* sp. presenta una relación directamente proporcional con la intensidad de luz y fotoperiodo (fig. 14), donde se encontró que los mayores valores en producción de biomasa fueron con 111 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ de intensidad de luz y sus tres fotoperiodos 16:8, 14:10 y 12:12 (0,59; 0,57 y 0,54 g / l respectivamente). El

análisis estadístico de varianzas infiere diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0,05$ y la prueba de Tukey indica que entre el tratamiento 8 y 9 (ver tabla 5) no hay diferencias significativas, y entre 7 – 8 y 7 – 9 si la hay, con 95 % de confianza, siendo los tratamientos con mayor producción.

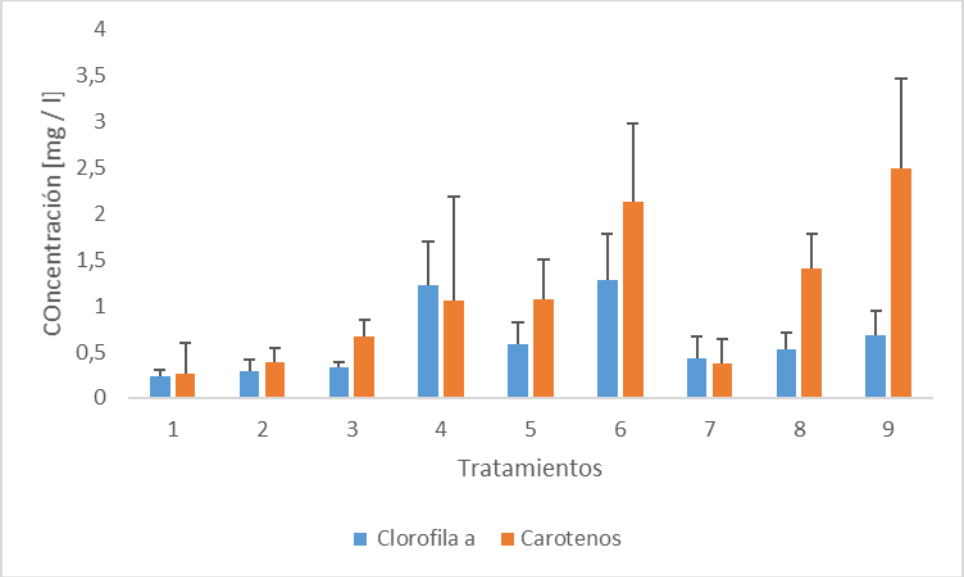

Figura 15. Concentración de clorofilas y carotenos en *Synechococcus* sp.

La fig. 15 muestra el contenido de clorofilas por *Synechococcus* sp. al cabo de 15 días de iniciado el cultivo, se observa que las irradiancias de 18,5 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ y 111 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ presentan una relación de aumento en el contenido de este pigmento a medida que aumentan las horas de luz y disminuyen las de oscuridad. Sin embargo, la irradiancia de 55,5 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ obtuvo la mayor concentración de clorofilas en fotoperiodo 16:8 seguido del 12:12 (1,28 y 1,22 mg / l), estadísticamente con un $p < 0,05$ la prueba de Tukey no establece diferencias significativas entre estos dos tratamientos. El contenido de carotenos muestra el mismo patrón presentado en producción de biomasa por peso seco y concentración de clorofilas, donde el aumento de la irradiancia y las horas de día en el fotoperiodo se refleja en el aumento de carotenos. Teniendo el mayor contenido (2,49 mg / l) para la intensidad de luz de 111 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ y un fotoperiodo 16:8, seguido por el tratamiento con 55,5 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ de irradiancia y fotoperiodo 16:8 (2,12 mg / l) De igual manera, estadísticamente estos dos tratamientos no presentan diferencias significativas con un 95 % de confianza.

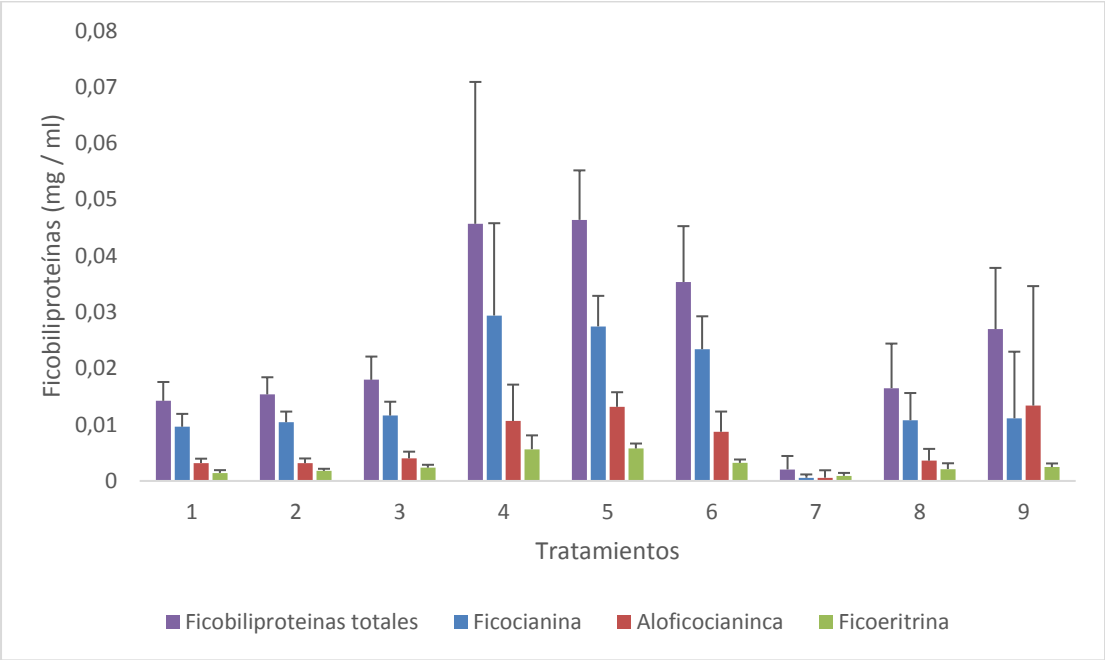

Figura 16. Concentración de ficobiliproteínas en *Synechococcus* sp.

La mayor concentración de ficobiliproteínas está en lo tratamientos 4, 5 y 6 (ver tabla 5), con 0,045; 0,046; 0,035 mg / ml respectivamente (fig. 16), estadísticamente el experimento 4 no presenta diferencias significativas al compararlo con el 5 y 6. Sin embargo, el 5 si presenta diferencias significativas con el 6, con un $p < 0,05$. Además, se observa que ficocianina es el pigmento de mayor concentración en *Synechococcus* sp. seguido por aloficiocianina.

4.4.2 *Stanieria* sp.

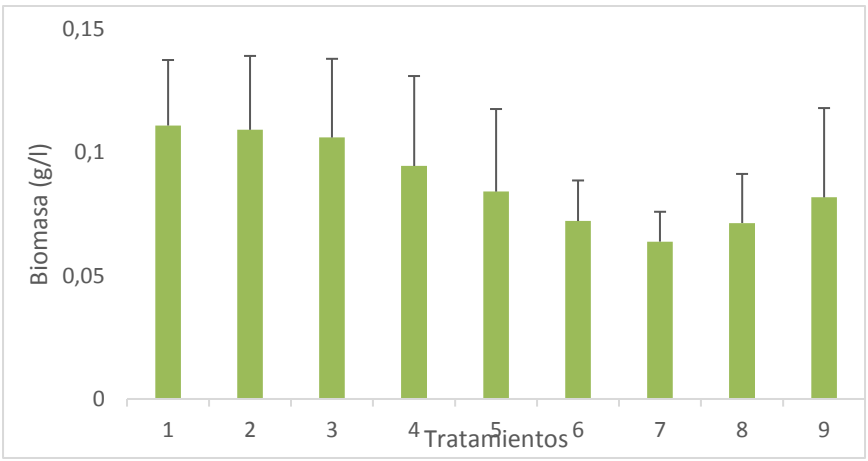

Figura 17. Producción de biomasa en cultivo de 30 días de *Stanieria* sp.

Stanieria sp. es un organismo que produce poca biomasa donde se tiene un máximo de 0,11 g / l al cabo de 30 días bajo las condiciones del tratamiento 1 (tabla 5), seguido del tratamiento 2 (0,109 g / l) y 3 (0,106 g / l) (fig. 17), estos dos últimos tratamientos no presentan diferencias significativas estadísticamente.

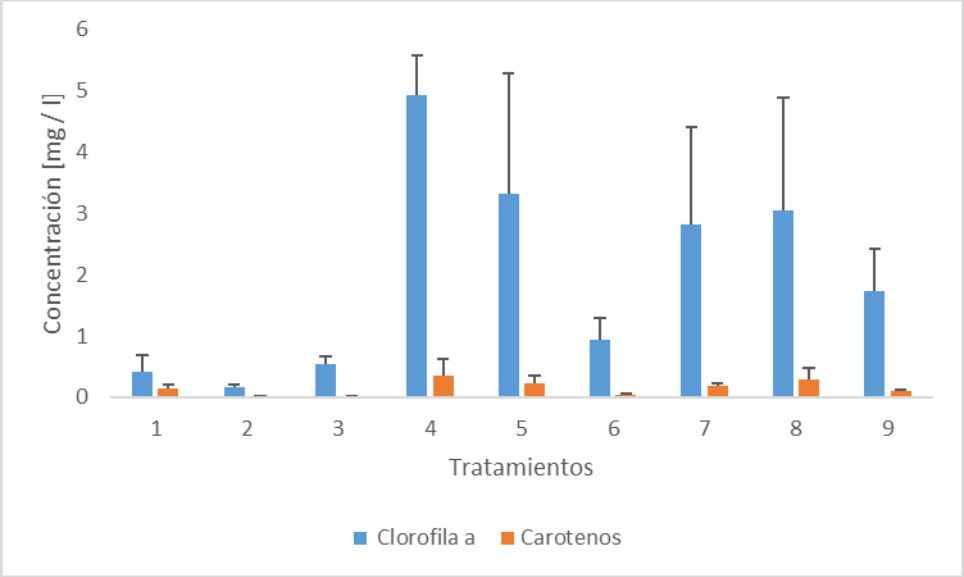

Figura 18. Concentración de clorofilas y carotenos en *Stanieria* sp.

A diferencia de biomasa en peso seco de *Stanieria* sp. los tratamientos 1, 2 y 3 presentaron el menor contenido de clorofilas (fig. 18) y el tratamiento 4 con un fotoperiodo 12:12 e intensidad de luz 55,5 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ presento la mayor concentración con 4,93 mg / l seguido de 3,31; 3,05 y 2,82 mg / l (tratamientos 5, 8 y 7 respectivamente). Los análisis estadísticos muestran diferencias significativas entre el tratamiento 4 con el 5, 7 y 8. De igual manera, tenemos que el tratamiento 4 cuenta con la máxima concentración de carotenos (0,34 mg / l), precedido por el tratamiento 8 con 0,28 mg / l (fig.18), sin presentar diferencias significativas entre estos de acuerdo con las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey.

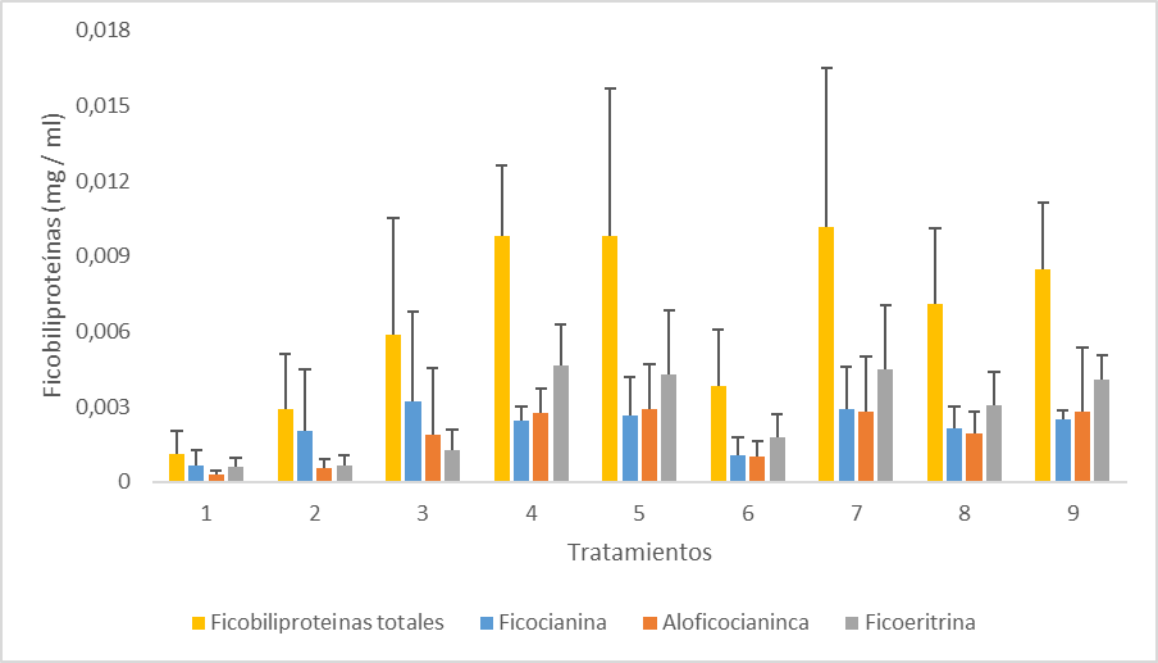

Figura 19. Concentración de ficobiliproteínas en *Stanieria* sp.

El máximo contenido de ficobiliproteínas totales (fig.19) en *Stanieria* sp. se encuentran en los tratamientos 7, 5 y 4 con 10,16; 9,81 y 9,78 µg / l respectivamente. La prueba estadística de Tukey para comparaciones múltiples no muestra diferencias significativas entre estos. La ficoeritrina se presenta en mayor concentración al comparar con la ficocianina y aloficocianina en los tratamientos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con un máximo en el fotoperiodo 12:12 e irradiancia de 55,5 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ (4,63 µg / l), seguido de 4,47 µg / l (tratamiento 7), las comparaciones entre estos experimentos no muestran diferencias significativas.

4.4.3 *Leptolyngbya* sp. 3

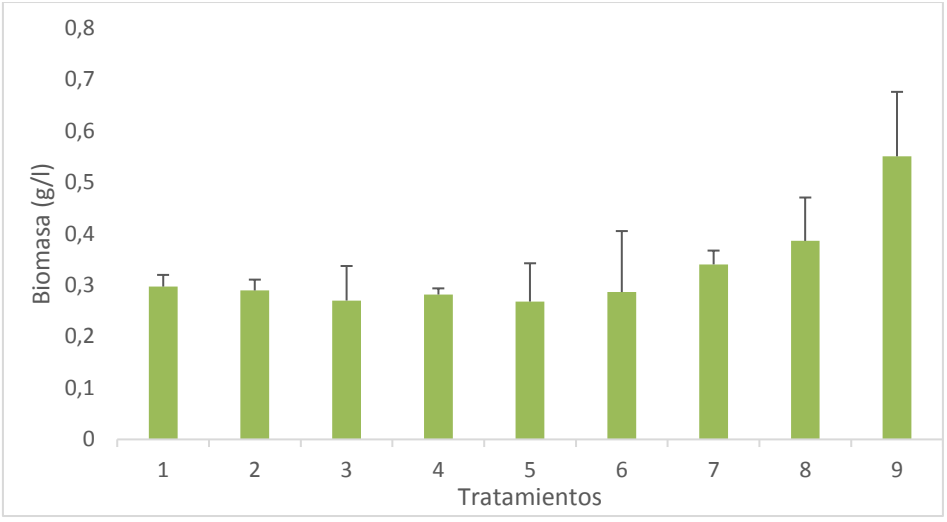

Figura 20. Producción de biomasa en cultivo de 15 días de *Leptolyngbya* sp. 3.

La biomasa producida por *Leptolyngbya* sp. 3. reflejada en peso seco tiene su máximo valor en el tratamiento 3 (0,55 g / l) seguido del 0,38 g / l (tratamiento 8) (fig. 20), estadísticamente hay diferencias significativas.

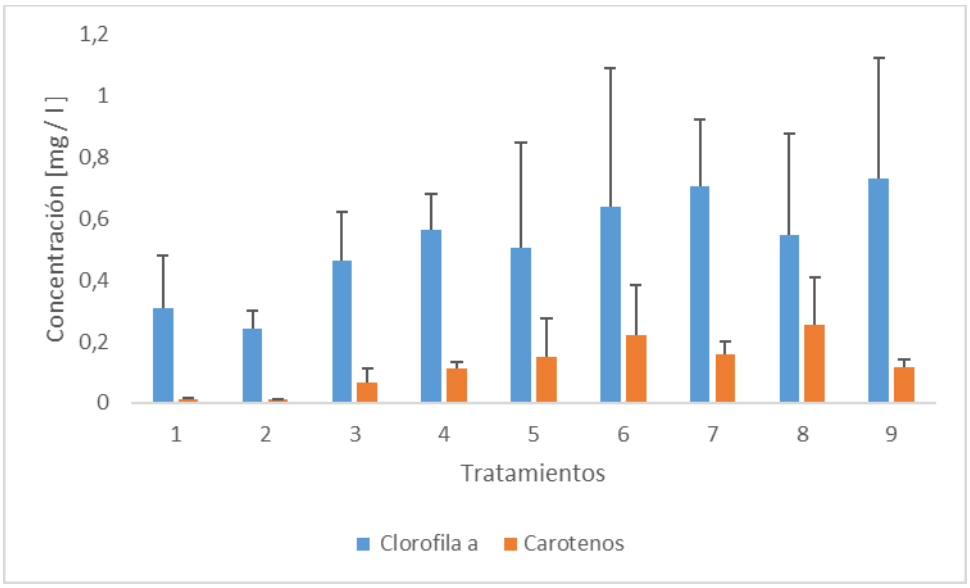

Figura 21. Concentración de clorofilas y carotenos en *Leptolyngbya* sp 3.

La concentración de clorofilas en *Leptolyngbya* sp. 3. (fig. 21) presenta un máximo de 0,73 mg / l (tratamiento 9), y en segundo lugar el tratamiento 7 con 0,7 mg / l. El análisis de

Tukey muestra que estos dos experimentos no presentan diferencias significativas. De igual forma, no hay diferencias significativas entre los tratamientos 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.
Las concentraciones más altas de carotenos encontradas en *Leptolyngbya* sp fueron 30,25 mg / l (tratamiento 8) y 0,22 mg / l (tratamiento 6). Estadísticamente no se presentan diferencias significativas entre estos dos experimentos. Los valores más bajos de este pigmento se obtuvieron en los tratamientos 1, 2 y 3 (fig. 21).

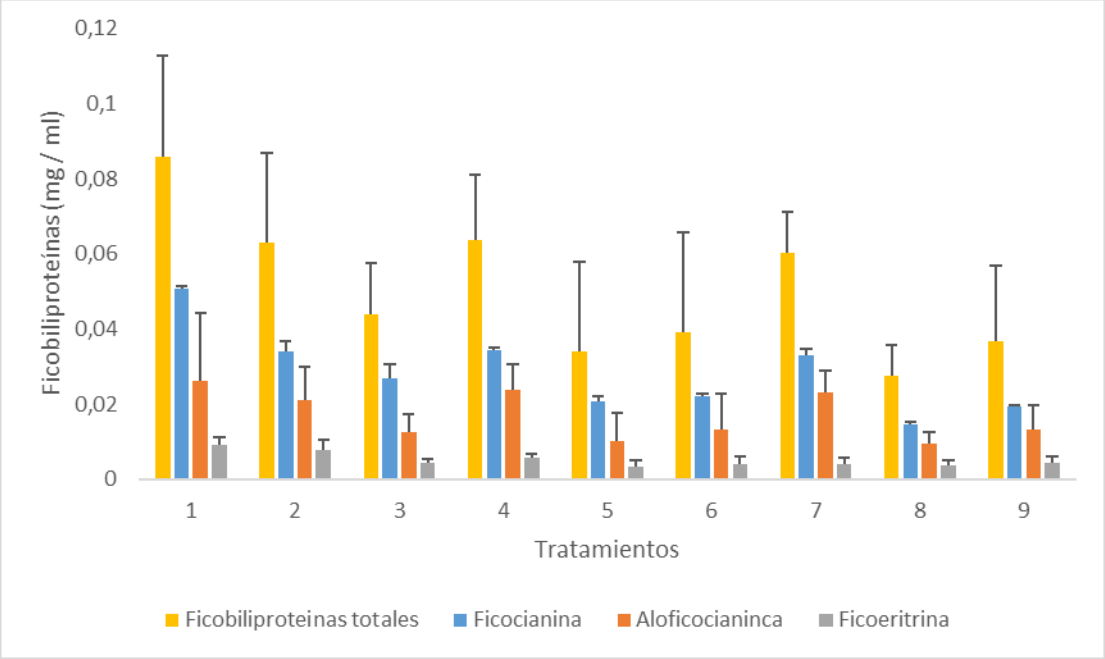

Figura 22. Concentración de ficobiliproteínas en *Leptolyngbya* sp. 3.

La producción de ficobiliproteínas por *Leptolyngbya* sp. 3. (fig. 17), presenta una relación negativa con las variables de fotoperiodo e intensidad de luz, es decir, la concentración de estos pigmentos aumenta cuando disminuye la irradiancia y horas de luz. El tratamiento 1 contiene 0,085 mg / ml seguido por los tratamientos 4 y 7 (0,063 y 0,060 mg / ml respectivamente). Estos tres experimentos no presentas diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey, con un $p< 0,05$.

4.5 Discusión

La diversidad de cyanoprokariotes y su gran potencial biotecnológico incentivan a buscar y mejorar las técnicas de cultivo para aumentar la producción de biomasa a gran escala y hacer de estos organismos un recurso natural sustentable.

De manera general, en el medio natural la irradiancia, el tiempo de exposición a la luz y la concentración de nutrientes son factores que afectan en gran medida el crecimiento de los cyanoprokariotes (Whitton & Potts 2000). Así, se observa cómo la variación del fotoperiodo y la intensidad de luz en cultivos a escala de laboratorio, están influenciando la producción de biomasa y pigmentos fotosintéticos (cloroifla *a*, carotenos y ficobiliproteínas) en *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp. 3 y *Stanieria* sp. (fig 14 - 22). Este efecto en cyanoprokariotes ha sido documentado por Baldia *et al.* (1991); Romo (1994); Loreto *et al*. (2003).

Stanieria es un género perteneciente a la familia Dermocarpellaceae y orden Pleurocapsales. Estos cyanoprokariotes son comúnmente bentónicos y con un estilo de vida epífito utilizando como sustrato a otros cyanoprokariotes filamentosos (Komárek & Anagnostidis 1998). Son organismos con contados estudios de investigación, dirigidos principalmente a la taxonomía (Tang *et al*. 2018; Prihantini *et al*. 2016; Silva & Pienaar 1999 (a); Silva & Pienaar 1999 (b) y a su rol ecológico (Wu 2016). Ahora bien, *Stanieria* sp. tuvo el máximo en peso seco (0,11 g / l) a una intensidad de luz de 18,5 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ y un fotoperiodo de 12:12 (fig. 17). Sin embargo, bajo estas condiciones la clorofila *a* y las ficobiliproteínas obtuvieron sus mínimos en concentración (fig. 18 y 19). Además, se muestra que el aumento del tiempo en la exposición a la luz afecta negativamente estos pigmentos. Este cyanoprokariote presentó mayor contenido de ficoeritrina (4,66 µg / ml) respecto a ficocianina y aloficocianina (3,21 y 2,9 µg / ml) (fig. 19). La ficoeritrina es un pigmento con aplicaciones en inmunoensayos y microscopía de fluorescencia para diagnósticos e investigación biomédica (Guerrero *et al*. 1999).

Synechococcus sp. es un organismo tolerante a altas irradiaciones (Beljamin & Trekenšu 1977; Mastala *et* al. 1996). Esta característica se ve reflejada en la fig. 14 donde a mayor intensidad de luz (111 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$) se obtuvo la mayor producción de biomasa en peso seco (0,59 g / l), a su vez, este incremento se ve favorecido por el aumento del tiempo a la exposición de la luz (fotoperiodo 16:8). Esta relación positiva entre la acumulación de biomasa y el fotoperiodo y la intensidad de luz también se ve manifestada en el contenido de carotenos (fig 15). El aumento de este pigmento en función de altas irradiancias ha sido observado por Rosales *et al*. (2008), quienes en una cepa de *Synechococcus* sp. aislado de un pozo hipersalino en Maracaibo - Venezuela, quienes, encontraron un contenido de

clorofila a de 7,72 y 7,36 mg / l a irradiancias de 78 y 156 µmol*m^{-2}*s^{-1} respectivamente, aún mayores que las alcanzadas en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos indican que esta cepa de *Synechococcus* sp. (cepa 1) no solo prefiere intensidades de luz intermedias (55,5 µmol*m^{-2}*s^{-1}) al igual que exposiciones a la luz más prolongadas (fotoperiodo 16:8). En trabajos realizados por Tandeau & Houmard 1993, alude un aumento de clorofila a, a bajas irradiancias, por un mayor desarrollo de membranas tilacoidales y de ficobilisomas para captar toda la energía radiante posible. Asimismo, Rosales *et al*. (2008) obtuvieron un máximo de carotenos de 0,65 mg / l a 234 µmol m^{-2} s^{-1}, en comparación con 2,49 mg / l a 111 µmol m^{-2} s^{-1} que se alcanzaron en el presente trabajo, esto muestra la diversidad que se puede alcanzar dentro de un mismo género e incluso la misma especie, pero cepas distintas.

Un factor metodológico a tener en cuenta es que las técnicas espectrofotometricas tienden a sobreestimar la concentración de clorofila a, ya que no discriminan entre el pigmento y sus productos degradados (feofitinas). La feofitina es una clorofila que ha perdido su átomo de magnesio y estas coinciden con a presentar el punto máximo de absorbancia a la misma longitud de onda (Yentsch *et al.* 1963; Marker 1972).

El contenido de ficobiliproteínas en *Synechococcus* sp. presentó un máximo de 29,4 µg / ml en ficocianina, mientras que la concentración de aloficocianina se vio mejorada a 111 µmol m^{-2} s^{-1}(13,3 µg / ml). Estos valores de ficocianina son superiores a los presentados por Gantar *et al*. (2012) donde reporta que una cepa de *Synechococcus* sp. a 50 µmol m^{-2} s^{-1} presentó 18,2 µg / ml y Wyman *et al*. (1985) a 60 µmol m^{-2} s^{-1} tan solo obtuvo 1 µg / ml, mostrando que las cepas aisladas del presente estudio tendrían un mejor potencial para la obtención de estos pigmentos de interés económico. Sin embargo, para ficoeritrina los valores son inferiores a los encontrados por Wyman *et al*. (1985) donde alcanzaron 45,8 µg / ml a 20 µmol m^{-2} s^{-1}, a diferencia de los obtenidos (5,76 mg / l a 55,5 µmol m^{-2} s^{-1}).

La cepa de *Leptolyngbya* sp. 3 presentó su máximo de producción en peso seco de 0,55 g / l (fig. 20) y clorofila a (0,73 mg / l) (fig. 21) con el tratamiento 9 (ver tabla 5), igualmente la irradiancia de 111 µmol m^{-2} s^{-1} favoreció el contenido de carotenos (0,25 mg / l) (fig. 20), este aumento positivo en pigmentos fotosintéticos y biomasa en función de la intensidad de luz ha sido observado por Rücker *et al.* (1995) en *Planktothrix agardhii,* Miskiewicz *et*

al. (2000) en *Plectonema boryanum*. Por otra parte, las variables de los tratamientos 1 al 8 (tabla 5) parecen no influir en el crecimiento (biomasa en peso seco) de *Leptolyngbya* sp. 3, puesto que en el rango de irradiancia entre 18,5 y 111 µmol m^{-2} s^{-1} no se logró evidenciar diferencias significativas ($p > 0,05$) (Anexo B). Wilmotte (1988) mostró que 6 cepas de *Phormidium* cf. *ectocarpi,* presentan crecimiento diferenciado al aumentar la irradiancia. Por tal razón, Tandeau & Houmard (1993) indican que los cyanoprokariotes pueden tolerar desde la luz solar directa hasta irradiancias entre 1 y 2 µmol m^{-2} s^{-1}. Siendo la respuesta de *Leptolyngbya* sp. 3, ante la modificación de variables en cultivo de laboratorio (irradiancia y fotoperiodo) una demostración que estos organismos tienen comportamientos disimiles y la respuesta depende de cada cepa de cyanoprokariote.

El contenido de ficobiliproteínas en *Leptolyngbya* sp. 3 fue mayor (85,3 µg / ml) en condiciones de 18,5 µmol m^{-2} s^{-1} y fotoperiodo 12:12 (tratamiento 1) (tabla 5) respecto a los otros tratamientos (fig. 22), mostrando una relación inversa con el contenido de clorofila a y carotenos. Alves de Oliveira *et al*. (2014) con dos cepas de *Nostoc* y Loreto *et* al. (2003) con una de *Anabaena*, obtuvieron resultados similares. Donde las intensidades de luz bajas aumentaron el contenido de ficobiliproteínas. La disminución de estos pigmentos se da como estrategia de protección contra el daño fotooxidativo (Alves de Oliveira *et al*. 2014).

4.6 Conclusiones

Las condiciones óptimas de intensidad de luz y fotoperiodo para el cultivo de cyanoprokariotes no solo dependen de la cepa utilizada (*Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp. 3 y *Stanieria* sp.), también de su finalidad, ya sea para producción de biomasa (peso seco) y/o pigmentos fotosintéticos (clorofila a y ficobiliproteínas). Puesto que la irradiancia y fotoperiodo que da un máximo de rendimiento en biomasa no coincide con la que se optimiza en la producción de los pigmentos como ficobiliproteínas.

Leptolyngbya sp. 3 y *Synechococcus* sp, producen mayor biomasa, estimada en peso seco, a mayor irradiancia y mayor horas luz, mientras que *Stanieria* sp es susceptible a altos niveles de irradiancia deteniendo su crecimiento.

El fotoperiodo fue el principal factor para promover la producción de carotenos, donde *Synechococcus* sp aumentó carotenos a mayor número de horas luz, mientras que *Stanieria* sp aumentó carotenos a menor número de horas luz.

La irradiancia fue el principal factor para promover la producción de ficobiliproteínas para *Synechococcus* sp quién aumento su contenido a irradiancias medias, en *Leptolyngbya* sp. 3 al contrario va aumentando el contenido de ficobiliproteínas a medida se disminuye la irradiancia, y finalmente *Stanieria* sp aumenta concentración con irradiancias mayores.

4.7 Bibliografía

Albertano P, Bruno L, D'ottavi D, Moscone D & Palleschi G. (2000). Effect of photosynthesis on pH variation in cyanobacterial biofilms from Roman catacombs. Journal of Applied Phycology. 12: 379 – 384.

Alves de Oliveira C, Oliveira W, Ribeiro S, Stringheta P & Galvão do Nascimento A. 2014. Effect of light intensity on the production of pigments in *Nostoc* SPP. European Journal of Biology and Medical Science Research. 2(1):23-36.

Andersen R. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
Aordero B, Herrero C, Abalde J. 1997. Manual de técnicas bioquímicas aplicadas a ficología. Universidade da Coruña.

Arredondo B, Voltolina D, Zenteno T, Montoya M & Gómez G. 2017. Métodos y herramientas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. Segunda Edición.

Azov Y. 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. Applied and Environmental Microbiology. 43(6):1300-1306.

Baldia S, Nishijima T & Hata Y. 1991. Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Spirulina platensis* isolate from Lake Kojima, Japan. Suisan Gakkanishi. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish 57: 481 – 490.

Beljanim V & Trekenšu A. 1977. Growth and spectrophotometric characteristics of the blue-green alga *Synechococcus elongatus* under different temperature and light conditions. Archiv fur Hydrobiologie. Supplementband: Algological Studies. 18: 46 – 66.

Bennett A & Bogard L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. Journal Cell Biology. 58: 419-435.

Craigie J, Correa J & Gordon M. 1992. Cuticles from *Chondrus crispus* (Rodophyta). Journal of Phycology. 28: 777 – 786.

Cronberg G & Anndotter H. 2006. Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology. Copenhague, Dinamarc: ISSHA & IOC of UNESCO.

Gantar M, Simovic D, Djilas S, Gonzalez W & Miksovska J. 2012. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. Journal Biotechnology, 159: 21 - 26.

Guerrero M, Rodríguez H, Vargas M, García M, del Campo J, Moreno J & Rivas J. 1999. Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial. Biotecnología y aplicaciones de microorganismos pigmentados. Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións. 215 – 232.

Henderson R, Leftyley J & Sargent J. 1988. Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Crypthecodinium conhii*. Phytochemistry. 27: 1679 – 1683.

Henrikson R. 1989. New medical research with Spirulina. En: Earth Food Spirulina, Ronore Enterprises Inc. Laguna Beach, California. Pag. 61 - 73.

Hoffmann L. 1988. Criteria for the classification of blue-green algae at the genus and at the species level. Archives of Hydrobiology / Algological Studies 50: 131-139.

Jeffrey S. & Humphrey G. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, C1 and C2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochemie und Physiologie der Pflanzen. Vol. 162. pag. 191 -194.

Kehoe D. 2010. Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 107: 9029-9030.

Komárek J. & Anagnostidis K. 1998. Cyanoprokaryota I. Teil: Chroococcales. - In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (Eds): Süsswasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer, Jena Stuttgart-Lübeck-Ulm.

Lee R. 1999. Phycology. Cambridge University Press. Edimburgo, Inglaterra.

López D, Sánchez J, García F, García J & Molina E. 1993. Improvement of eicosapentaenoica cid content in isolates of *Isochrysis galbana*. Journal of Marine Biotechnology. 1: 147 – 149.

Loreto C, Rosales N, Bermúdez J & Morales E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* pcc 7120 en relación a la concentracion de nitrogeno e irradiancia. Gayana Botanica. 60(2): 83-89.

Marker A. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshwater Biology 2: 361 - 385.

Mastala Z, Herodek S, Balogh K, Bobely G, Shafik H & Voeroes L. 1996. Nutrient requirement and growth of a *SYnechococcus* species isolated from lake Balaton. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie 81: 503 – 512.

Melgarejo L. (2010). Experimentos en fisiología vegetal. Bogotá, D.C. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Miskiewicz E, Ivanov A, Williams J, Khan M, Falk S & Huner N. 2000. Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. Plant and Cell Physiology. 41: 767 – 775.

Molina E, Sánchez J, García F, García J, Acién F & López D. 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII4 in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology 37: 159 – 166.

Mundt S, Kreitlow S, Nowotny A & Effmert U. 2001. Biochemical and pharmacological investigations of selec cyanobacteria. nternational Journal of Hygiene and Environmental Health. 203: 327 – 334.

Paniagua M. 1994. Biotecnología microalgal y obtención de productos químicos alimenticios. Serie Científica UABCS, 2: 109-119.

Prihantini N, Sjamsuridzal W & Yokota A. 2016. Description of Stanieria strain of cyanobacteria isolated from hot spring in Indonesia. International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences 2015. DOI: 10.1063/1.4946969.

Richmond A. 1990. Large scale microalgal culture and applications. In: Progress in Phycological Research. eds F.E. Round & D.J. Chapman), pp. 269-330. Bioprocess, Bristol.

Romo S. 1994. Growth parameters of *Pseudoanabaena gaelata*. Böcher in culture under different light and temperature conditions. Algol. Studies. 75: 239 – 248.

Rücker J, Kohl J & Kaiser K. 1995. Response of carotenoids to variations of growth – limiting factors in three filamentous blue – green algae. Algol. Studies. 77: 51 – 65.

Sánchez A. 2012. Manejo Ambiental en Seaflower, Reserva de Biósfera en el Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina. Documentos de trabajo sobre economía regional. Banco de la República. 176:44.

Shivaun D, McDonald K, & Jackman A. 1997. Effect of light irradiance on the production of sulfolipids from Anabaena 7120 in a fed-batch photobioreactor. Applied Biochemistry and Biotechnology., 67(1-2): 139-152.

Silva S & Pienaar R. (a) 1999. Benthic marine cyanophyceae of Mozambique. South African Journal of Marine Science. 21: 259 – 270.

Silva S & Pienaar R. (b) 1999. Marine cyanophytes from the Western Cape, South Africa: Chroococcales. South African Journal of Botany. 65(1): 32 – 49.

Simeunović J, Bešlin K, Svirčev Z, Kovač D & Babić O. 2013. Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. Journal of Applied Phycology. 25: 597-607.

Sorokin C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: Hanbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Stein J. Editorial Cambridge University Press. Cambridge. 321 – 343.

Spriharan S, Bagga D & Nawaz M. 1991. The effects of nutrients and temperature on biomas, growth, lipid production, and fatty acid composition of *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin and Guilard. Applied Biochemistry and Biotechnology. 28 / 29: 317 – 326.

Tandeau de Marsac N & Houmar J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. FEMS Microbiology Reviews 104: 119 - 190.

Tang J, Jiangb D, Luob Y, Liang Y, Li L, Shah M & Daroch M. 2018. Potential new genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China. Algal Research 31: 14 – 20.

Vieira J, Linde G, Pires D, Martinez G & Trapp K. 2004. Modelling of growth conditions for cyanobacterium Spirulina platensis in microcosms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16:15-18. Physiology, Cell-biology and Biotechnology. Editorial Taylor and Francis. 213 – 215.

Vonshak A. (1987). Strain selection of Spirulina suitable for mass production. Hydrobiologia 151: 75 – 77.

Whitton B & Potts M. 2000. The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space. Springer Netherlands. Edición 1.

Wilmotte A. 1988. Growth and morphological variability of six strains of Phormidium cf. ectocarpi Gomont (Cyanophyceae) cultivated under different temperatures and light intensities. Archives of Hydrobiology/ Algological Studies 50-53: 35-46.

Wu Y, Yu G, Jiang H, Liu L & Zhao R. 2016. Role and lifestyle of calcified cyanobacteria (Stanieria) in Permian-Triassic boundary microbialites. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 448: 39 - 47.

Wyman M, Gregory F & Carr N. 1985. Novel Role for Phycoerythrin in a Marine Cyanobacterium, *Synechococcus* Strain DC2. Science. 230: 818 – 820.

Yentsch C & Menzel D. (1963). A Method For The Determination Of Phytoplankton, Chlorophyll, And Pheophytin By Fluorescence. Deep Sea Research, 10: 221 - 231.

Yim J, Kim S, Ahn S, Lee C, Rhie K & Lee H. 2004. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga Gyrodiniumimpudicums train KG03. Marine Biotechnology., 6: 17-25.

Zhu C & Lee Y. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. Journal of Applied Phycology. 9: 189 – 194.

5. Composición bioquímica y evaluación de metabolitos secundarios de los cyanoprokariotes marinos *Synechococcus* sp. (Synechococcales), *Stanieria* sp. (Pleurocapsales) y *Leptolyngbya* sp. (Synechococcales)

5.1 Resumen

El presente trabajo evaluó el efecto de la irradiancia y fotoperiodo en el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos en *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp. 3 y *Stanieria* sp. La biomasa se obtuvo a partir de cultivos discontinuos de 250 ml sometidos a intensidades de luz de 18,5; 55,5 y 111 µmol*m^{-2}*s^{-1} y horas de exposición a la luz de 12, 14 y 16. Cada tratamiento con 6 réplicas. Obteniendo que *Synechococcus* sp. presento la mayor concentración en proteína con 80 µg / ml, *Stanieria* sp. en carbohidratos con 90,6 µg / ml y *Leptolyngbya* sp 3 en lípidos con 14,4 µg / ml, destacando que todos fueron obtenidos en el fotoperiodo 12:12. Además, se realizó un estudio preliminar de bioactividad a extractos crudos de 18 cepas sobre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), E*scherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 25241), *Candida albicans* (ATCC 10231) y las líneas celulares de neuroblastoma humano, cáncer de mama, cáncer hepático, Cáncer de colon y HDMC Células endoteliales de cerebro humano. Los resultados arrojaron que tan solo la cepa 3 inhibe el crecimiento de *bacillus subtilis* y 11 cepas el de bacterias Gram negativas. Todos los extractos crudos mostraron reducir la viabilidad de la célula de cáncer en diferentes porcentajes, resaltando la cepa 1 y 13. Finalmente se hizo un test de toxinas para microcistinas y nodularinas por ELISA y la cepa 7 dio positivo con una concentración de 0,3 µg / l.

Palabras Clave: Cianobacterias, Líneas celulares de cáncer, bioactividad, extractos crudos, composición bioquímica.

Abstract

The present work evaluated the effect of irradiance and photoperiod on the content of proteins, carbohydrates and lipids in *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp. 3 and *Stanieria* sp. The biomass was obtained from discontinuous cultures of 250 ml subjected to light intensities of 18.5; 55.5 and 111 µmol * m-2 * s-1 and hours of light exposure of 12, 14 and 16. Each treatment with 6 replicas. Obtaining that Synechococcus sp. I present the highest protein concentration with 80 µg / ml, Stanieria sp. in carbohydrates with 90.6 µg / ml and Leptolyngbya sp 3 in lipids with 14.4 µg / ml, highlighting that all were obtained in the 12:12 photoperiod. In addition, a preliminary bioactivity study was conducted on crude extracts of 18 strains on Bacillus subtilis (ATCC 6633) Staphylococcus aureus (ATCC 29213), Escherichia coli (ATCC 25922), Salmonella typhimurium (ATCC 25241), Candida albicans (ATCC 10231) and the cell lines of human neuroblastoma, breast cancer, liver cancer, colon cancer and HDMC Endothelial cells of the human brain. The results showed that only strain 3 inhibits the growth of bacillus subtilis and 11 strains that of Gram negative bacteria. All the crude extracts showed to reduce the viability of the cancer cell in different percentages, highlighting strains 1 and 13. Finally a toxin test was done for microcystins and nodularins by ELISA and strain 7 was positive with a concentration of 0.3 µg / l.

Keywords: Cyanobacteria, cancer cell lines, bioactivity, crude extracts, biochemical composition.

5.2 Introducción

Los cyanoprokariotes son organismos con alto potencial biotecnológico debido a la variedad fisiológica, su adaptación a diferentes condiciones ambientales sobresaliendo los ambientes extremos (Whitton & Potts 2000), su producción de metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural y funciones alelopáticas, protección de radiación UV, impedir la herbivoría, inhibición del quórum sensing (Puglisi *et al*. 2014), actividad antiviral, inmunomoduladora y citotóxica en algas, bacterias y hongos (Thajuddin & Subramanian, 2005).

Dentro de este grupo de organismos se encuentran especies como *Arthrospira maxima* utilizada por la industria alimentaria por su valor nutricional proteico entre 55 % - 70 %, adicionalmente contiene ácidos grasos esenciales 18 %, omega 3 y 6, vitaminas, minerales, clorofila a, ficobiliproteínas, betacarotenos, compuestos fenólicos y Ca-Spirulan (compuesto con actividad antiviral) (Sánchez *et ál*. 2003; Chamorro *et ál*. 2002). No obstante, el contenido de carbohidratos y lípidos en cyanoprokariotes también obtienen su interés por la industria de los biocombustibles, con estudios en *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima* (Mata *et al*. 2010) y *Synechocystis* sp. (Xipell 2011).

Los cyanoprokariotes son conocidos por sintetizar cianotoxinas que afectan de manera negativa a otros organismos (animales y humanos), producidas especialmente por especies dulceacuícolas (Zurawell *et al*. 2005). Estas toxinas se encuentran dentro de la célula, siendo liberadas cuando se produce lisis celular (Carmichael, 1992). La diversidad estructural de estas toxinas hace que tengan un amplio rango de acción, clasificándolas como hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas (Briand *et al*. 2003). Las cianotoxinas comúnmente conocidas de ambientes continentales son la hepatotoxina microcistina encontrada principalmente en *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix agardhii* (Prasanna *et al*. 2010) y la citotoxina cilindrospermopsina sintetizada por *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Aphanizomenon ovalisporum* (Pinheiro *et al*. 2013; Codd *et al*. 2005) y marinos la hepatoxina nodularina comúnmente en *Nodularia spumigena* (Azevedo 1998).

En la última década, las investigaciones de los metabolitos secundarios producidos por cyanoprokariotes marinos con miras a la industria farmacéutica, biomédica y el sector de

la agricultura han llevado al descubrimiento de más de 400 nuevos compuestos naturales principalmente péptidos no ribosomales, policétidos e híbridos (péptidos no ribosomales – policétidos). Ya para el año 2016 se aislaron un total de 126 nuevos compuestos, principalmente de los géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Symploca* (Mi *et al*. 2017). Entre estos compuestos con potenciales aplicaciones biotecnológicas tenemos el poli-β-hidroxibutirato usado en la producción de bioplásticos (Balaji 2013), la Hierridina B extraído de *Cyanobium* sp. que altera el funcionamiento de la mitocondria (Freitas *et al*. 2016a) y las portoamidas que han mostrado citotoxicidad en células de cáncer humano (Ribeiro *et al*. 2017), metabolitos que también pueden encontrarse en los cyanoprokariotes pertenecientes al picoplancton (Freitas *et al*. 2016b). Igualmente, estos compuestos cumple funciones alelopáticas inhibiendo el crecimiento de otras especies de cyanoprokariotes (Śliwińska *et al*. 2017) u otras bacterias (Bessa *et al*. 2016).

Teniendo en cuenta la importancia que han tomado los cyanoprocariotes en ámbito investigativo, este trabajo tiene como objetivo realizar una evaluación del efecto producido por la irradiancia y el fotoperiodo en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de *Synechococcus* sp. (cepa 1), *Stanieria* sp. (cepa 7) y *Leptolyngbya* sp 3 (cepa 3) (ver tabla 4) y hacer un acercamiento al potencial bioactivo de los cyanoprakariotes bentónicos de Providencia y Santa Catalina Islas - Colombia, en células de cáncer, bacterias y hongos.

5.3 Materiales y métodos

La biomasa liofilizada fue obtenida de cultivos realizados en botellas de vidrio de 375 ml con 250 ml de medio nutritivo ASNIII (Andersen 2005) para *Stanieria* sp. (cepa 7), por 30 días y BG11 para *Synechococcus* sp. (cepa 1), y *Leptolyngbya* sp 3 (cepa 3) (ver tabla 4) por 15 días. Todos los cultivos se mantuvieron a 23 ± 2 °C de temperatura y aireación constante (4 ml de aire / s). Se evaluó la composición bioquímica (carbohidratos, lípidos y proteínas) de 9 tratamientos (combinatoria de dos variables intensidad de luz a 18,5; 55,5 y 111 $\mu mol*m^{-2}*s^{-1}$ y 3 de fotoperiodo 12:12; 14;10 y 16:8 horas días: horas oscuridad), cada uno con 6 réplicas.

Para la evaluación de metabolitos secundarios se utilizó biomasa liofilizada obtenida a partir de 18 cultivos de 250 ml con medio nutritivo BG11 (Andersen 2005) durante 15 días

a 23 ± 2 °C de temperatura, aireación constante de 4 ml de aire / s, irradiancia de 40,7 µmol*m^{-2}*s^{-1} y fotoperiodo 12:12.

5.3.1 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford 1976). Se pesó aproximadamente 0,01 g de biomasa liofilizada en tubos falcón de 15 ml, se adicionó 6 ml de buffer de fosfato de sodio [0,02 M; pH 6] (Melgarejo 2010) y perlas de sílice (para asegurar el rompimiento celular) se pasó por vortex durante 5 min y se centrifugo a 6000 rpm 5 min. Se extrajo 0,8 ml de sobrenadante y se dispuso en tubo epppendorf de 2 ml, se adiciono 0,2 ml de reactivo de Bradford (Bio-Rad 2006), se agitó fuertemente en un vórtex por un minuto e incubó por cinco minutos y la absorbancia se midió a 595 nm. Cada mezcla de reacción se realizó por triplicado.

5.3.2 Cuantificación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó por el método de DuBois (DuBois *et al*. (1956); Gerchakov & Hatcher 1972; adaptado por Melgarejo 2010). Se pesó aproximadamente 0,01 g de biomasa liofilizada en tubos falcon de 15 ml, se adicionó 6 ml de H_2O destilada y desionizada y perlas de sílice (para asegurar el rompimiento celular) se pasó por vórtex durante 5 min y se centrifugo a 6000 rpm 5 min. Se extrajo 210 µl de sobrenadante y se dispuso en tubo eppendorf de 2 ml, se adiciono 0,2 ml de fenol al 80% y 1 ml ácido sulfúrico (H_2SO_4), se agitó fuertemente en un vórtex por un minuto y se dejó enfriar a temperatura ambiente y en oscuridad (el compuesto que se forma es estable por 36 horas). Se midió la absorbancia a 485 nm. Cada mezcla de reacción se realizó por triplicado.

5.3.3 Cuantificación de lípidos

La determinación de lípidos se realizó por el método de Sulfofosfovainillina (Byreddy *et al.* 2016; Mishra *et al*. 2014; Cheng *et al*. 2011). Se pesó aproximadamente 0,01 g de biomasa liofilizada en tubos falcon de 15 ml, se adicionó 2ml de cloroformo:metanol [1:1] y perlas de sílice (para asegurar el rompimiento celular), se pasó por vortex durante 5 min y se centrifugo a 6000 rpm 5 min. Se extrajo 60 µl de sobrenadante y se dispuso en tubo eppendorf de 2 ml, se adiciono 300 µl de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, se colocó

en baño María a 90 °C 20 min para evaporar los solventes y propiciar la reacción de hidrolisis, se enfrió en congelador durante 10 min y se agregó 500 µl de ácido fosfórico al 17% - Vainillina [0,2 g de vainillina / ml ácido fosfórico al 17%]. Se agitó por vórtex y se midió a 540 nm. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

5.3.4 Detección y cuantificación de microcistinas y nodularinas

La detección de microcistinas y nodularinas se realizó por ELISA de acuerdo con Vasconcelos *et al*. (2011); Morais *et al.* (2014). Se utilizó Kit de Abraxis® Microcystins/Nodularins (ADDA) ES ELISA de 96 pozos, el cual permite la detección de Microcistinas y Nodularinas y sus congéneres a través de anticuerpos específicos. Se siguió el protocolo descrito por el fabricante y se leyó en lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader (BIO-RAD California USA) a 450 nm.

5.3.5 Extractos para pruebas de bioactividad

Para obtener la biomasa de cultivos monoalgales de cianobacterias, 17 fueron filtradas en filtro de tela con un tamaño de poro de 50 µm y uno se obtuvo por centrifugación a 6000 rpm durante 3 minutos. La biomasa obtenida se depositó en falcón de 15 mL y se congeló a -80 °C durante 24 horas; luego, se procedió a liofilizar durante 72 horas.

La biomasa liofilizada se pesó y se depositó en falcón de 50 ml y se suspendiendo en 10 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) / metanol (MeOH) en una concentración 2:1 respectivamente (Costa *et al*., 2016). Se puso agitación en shaker durante 5 minutos y se procedió a centrifugar a 4600 rpm durante 4 minutos. Los extractos (sobrenadante) se pasó por embudo de vidrio con tapón de algodón y se depositó en viales de 40 mL (este procedimiento se realizó tres veces por muestra). Los extractos fueron concentrado al vacío a 30 °C utilizando un rotaevaporador. Los extractos concentrados fueron refrigerados a -20 °C para su posterior uso en los diferentes análisis y experimentos.

5.3.6 Ensayos antimicrobianos y antifúngicos

La metodología realizada fue a partir de Gomes *et al*. (2014). Se prepararon 200 µL de extracto en DMSO (dimetilsulfóxido) en una concentración de 1 mg / ml. Las pruebas se realizaron a 5 cepas bacterianas. 2 bacterias Gram positivas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213*)*, 2 bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC25922) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 25241) y 1 levadura: *Candida albicans*

(ATCC10231). Se utilizó la técnica de discos impregnados. En primer lugar, se utilizaron cajas de Petri plásticas con medio nutritivo sólido Mueller-Hinton (MH – BioKar Diagnostics) previamente preparado. Se inoculó las cajas de Petri con cada una de las bacterias por técnica de estriado. Se colocó 5 discos de papel en medio nutritivo sólido por caja de Petri. Cada disco se impregnó con 15 µL de extracto y se incubó a 37 °C Al cabo de 24 horas se revisaron las cajas de Petri, observando si se presentaba halo de inhibición en el crecimiento microbiano.

5.3.7 Bioactividad en líneas celulares de cáncer

Para las pruebas con líneas celulares se suspendió el extracto en dimetilsulfóxido (DMSO) quedando una concentración de 10 mg de extracto / ml. La metodología empleada para prueba de citotoxicidad fue la de Costa *et al*., (2014) con algunas modificaciones. En cada bioensayo se evaluó la viabilidad celular mediante la reducción del bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (MTT) (fig. 23). En placas de cultivo de 96 pozos se sembraron 100 µl de cada línea celular con una concentración de $6 * 10^4$ células * ml^{-1}. Las líneas celulares usadas fueron SH-SY5Y (Neuroblastoma humano), T47D (Cáncer de mama), HepG2 (Cáncer hepático), RKO (Cáncer de colon), y HDMC (Células endoteliales de cerebro humano). Se incubaron durante 24 horas para permitir la adhesión de las células al sustrato. A continuación, se le adicionó 0,5 µl de extracto disuelto en DMSO en una concentración de 10 mg * ml^{-1}, como control negativo se usó DMSO al 5% y sin adicionar DMSO, como control positivo se utilizó DMSO al 20%, se incubaron durante 24 h y 48 h, a 37 ° C y 5% CO_2. Se aplicó 50 µl de MTT y se incubo nuevamente 4 h. Pasado el tiempo de incubación se centrifugo a 1200 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionó 100 µl de DMSO, se colocó en agitación durante 20 minutos y se procedió a leer absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas de detección múltiple GEN5TM (Biotek, Bad Friedrichshall, Alemania). Todos los ensayos se realizaron por 4 réplicas. La citotoxicidad se expresó como porcentaje de viabilidad celular considerando la viabilidad del 100% en el control negativo (células tratadas con DMSO al 5%).

Figura 23. Reacción de MTT con la enzima succionaldeshidrogenasa (Tomado de: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html)

5.4 Resultados

Las gráficas 24, 25 y 26 muestran la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Synechococcus* sp. (cepa 1), *Stanieria* sp. (cepa 7) y *Leptolyngbya* sp. 3. (cepa 3). Donde el eje x representa los tratamientos descritos en la tabla 5. Los datos de las concentraciones de carbohidratos, lípidos y proteínas cumplen todos los supuestos de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad de varianzas (anexo c), con una confianza del 95 %.

El mayor contenido de lípidos de *Synechococcus* sp. (cepa1) fue 10,04 µg / ml y se obtuvo con una irradiancia de 55,5 µmol*m^{-2}*s^{-1} y fotoperiodo 12:12 (fig. 19), seguido de 8,4 µg / ml del tratamiento 6, la prueba de Tukey indica que no hay diferencias significativas (anexo c) entre estos dos tratamientos. El tratamiento 4 también sobresale por el contenido de proteína 80 µg / ml. La concentración de carbohidratos fue mayor en el tratamiento 7 con 72,5 µg / ml. No se evidencia un patrón aparente de la relación entre irradiancia y fotoperiodo con la composición bioquímica.

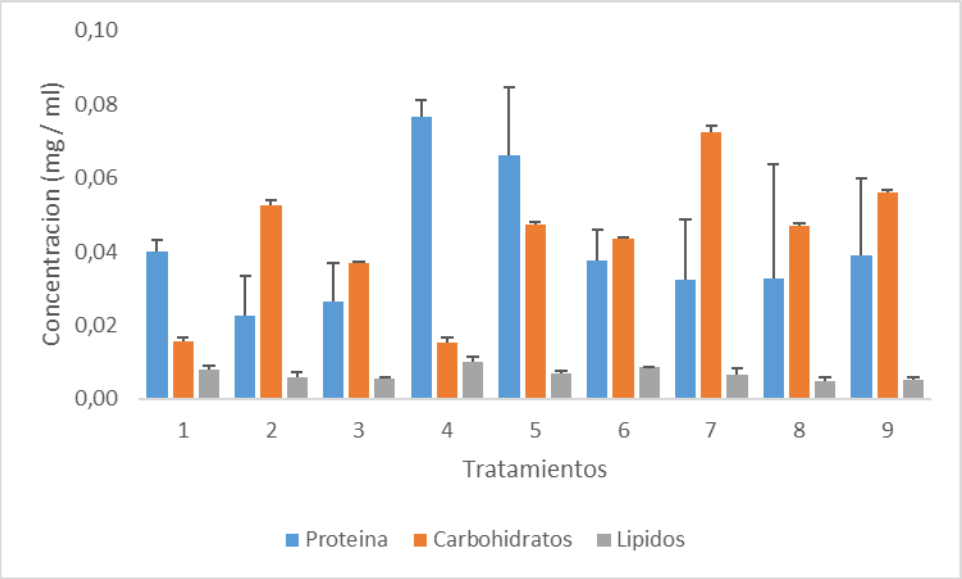

Figura 24. Composición bioquímica de *Synechococcus* sp.

La fig. 25 muestra que el contenido de carbohidrato está relacionado con el tiempo de exposición a la luz de *Stanieria* sp. (cepa 7) (ver tabla 4) con un máximo de 90,6 µg / ml seguido por 82,3 µg / ml de los tratamientos 4 y 5 respectivamente sin diferencias significativas (anexo c). Igualmente, en el tratamiento 4 se encontró la mayor concentración de lípidos con 11,2 µg / ml y el tratamiento 9 en proteínas con 52,8 µg / ml.

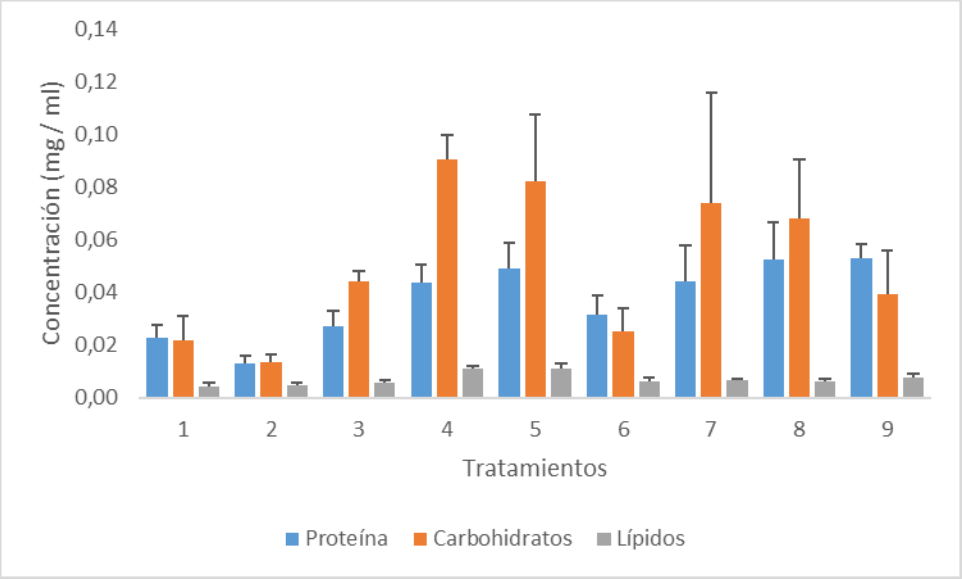

Figura 25. Composición bioquímica de *Stanieria* sp.

Leptolyngbya sp. 3. (cepa 3) no presenta diferencias significativas en el contenido de proteínas (anexo c) entre los tratamientos, obteniendo un máximo de 79,2 µg / ml en el tratamiento 1 (fig. 26). El mayor contenido de lípidos fue 14,4 µg / ml en el tratamiento 7 y para carbohidratos con 21,7 µg / ml en el tratamiento 9.

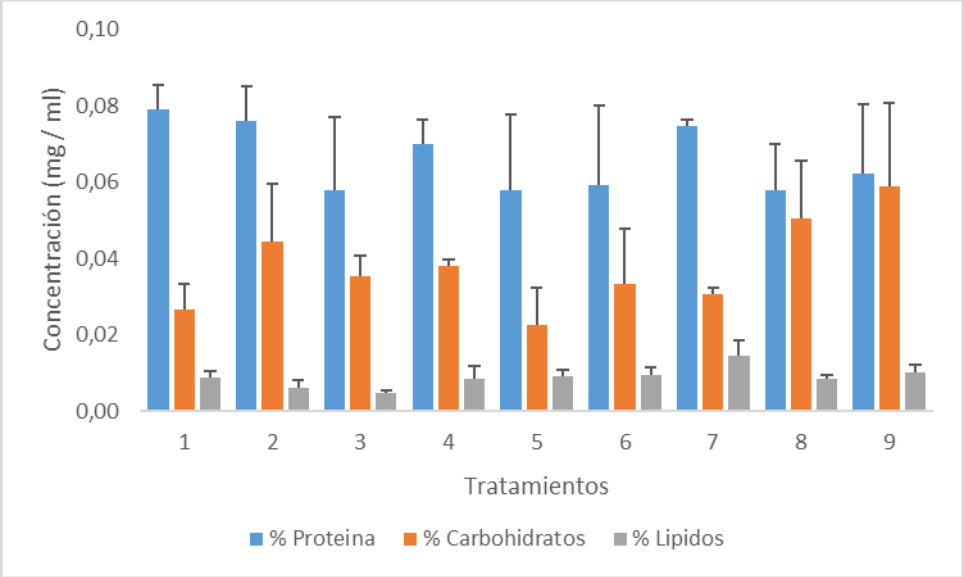

Figura 26. Composición bioquímica de *Leptolyngbya* sp. 3.

En la Tabla 6, se observa el peso de los extractos obtenidos para cada una de las muestras y el porcentaje de rendimiento. Este fue variable para todas las cepas (la identificación taxonómica de cada cepa es descrito en la tabla 4, capitulo 3) teniendo valores desde 3,06 % hasta 22,98 % para las cepas 7 y 19 respectivamente. Se debe destacar que los extractos de las cepas 7 y 8 del género *Stanieria*, (identificación por morfología) fueron los que presentaron el menor rendimiento (3,06 % - 4,19 %).

# de Cepa	Peso Muestra (g)	Peso Extracto (g)	% Rendimiento
1	1,1479	0,1285	11,19
2	1,398	0,0567	4,06
3	0,8297	0,038	4,58
4	1,1827	0,1297	10,97
5	0,8213	0,0819	9,97

6	0,9667	0,068	7,03
7	0,6501	0,0199	3,06
8	0,3079	0,0129	4,19
9	2,3257	0,1278	5,50
11	0,3637	0,0294	8,08
13	1,4925	0,0993	6,65
15	0,5903	0,072	12,20
17	0,4507	0,0363	8,05
19	1,3265	0,3048	22,98
21	1,2468	0,2653	21,28
24	0,9275	0,161	17,36
25	0,4293	0,014	3,26
26	0,1711	0,0197	11,51

Tabla 6. Redimiendo de extractos con relación a la biomasa.

Las pruebas antimicrobianas (tabla 7) muestran que los extractos crudos no presentan bioactividad en bacterias Gram positivas excepto para el extracto de la cepa 3 que dio positivo en *Bacillus subtilis.* En bacterias Gram negativas los extractos crudos presentaron inhibición de crecimiento sobre *Escherichia coli* las cepas 1, 2, 3, 5, 6, 11, 13, 15, 17, 19 y 24; y para *Salmonella typhimurium* las cepas 2, 3, 6 y 15. Dentro de los resultados de mayor interés son los obtenidos sobre *Candida albicans,* donde tan solo al extracto crudo de la cepa 7 dio negativo.

Cabe aclarar que la cepa 26 por identificación morfológica corresponde a *Synechococcus* sp., este organismo no se identificó por métodos moleculares.

Cepa	**Crecimiento**				
	Bacillus subtilis	***Staphylococcus aureus***	***Escherichia coli***	***Salmonella typhimurium***	***Candida albicans***
1	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
2	**-**	**-**	**+**	**+**	**+**
3	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**
4	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**

5	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
6	**-**	**-**	**+**	**+**	**+**
7	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
8	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**
9	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**
11	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
13	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
15	**-**	**-**	**+**	**+**	**+**
17	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
19	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
21	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**
24	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
25	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**
26	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**

Tabla 7. Bioactividad de extractos crudos de cyanoprokariotes en cepas bacterianas. + positivo (inhibición de crecimiento bacteriano) – negativo (no presenta inhibición de crecimiento bacteriano).

Las pruebas de citotoxicidad en línea celular de cáncer SH-SY5Y, mostro que las cepas 1, 2 y 3 presentaron mayor bioactividad reduciendo la viabilidad de las células a 42,8 %; 52,9 % y 46,7 % respectivamente (fig. 27) pasadas 48 h. La cepa 26 redujo la viabilidad celular a 87 % siendo la menor bioactividad.

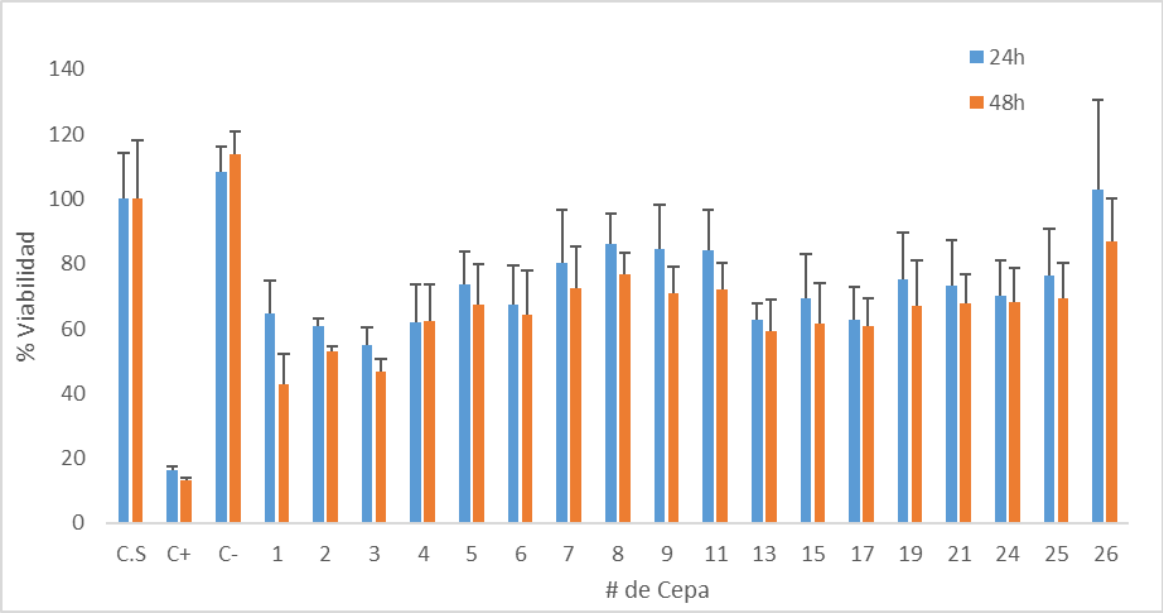

Figura 27. Prueba de citotoxicidad en línea celular SH-SY5Y

La viabilidad de la línea celular T47D fue reducido mayormente por la cepa 1 al 48,6 % y la cepa 13 al 52,7 % (fig. 28). También se observa que la actividad de los extractos frente a esta línea celular (excepto cepas 1, 11 y 13) pierden su efecto pasadas las 48 horas, ya que aumenta el porcentaje de viabilidad.

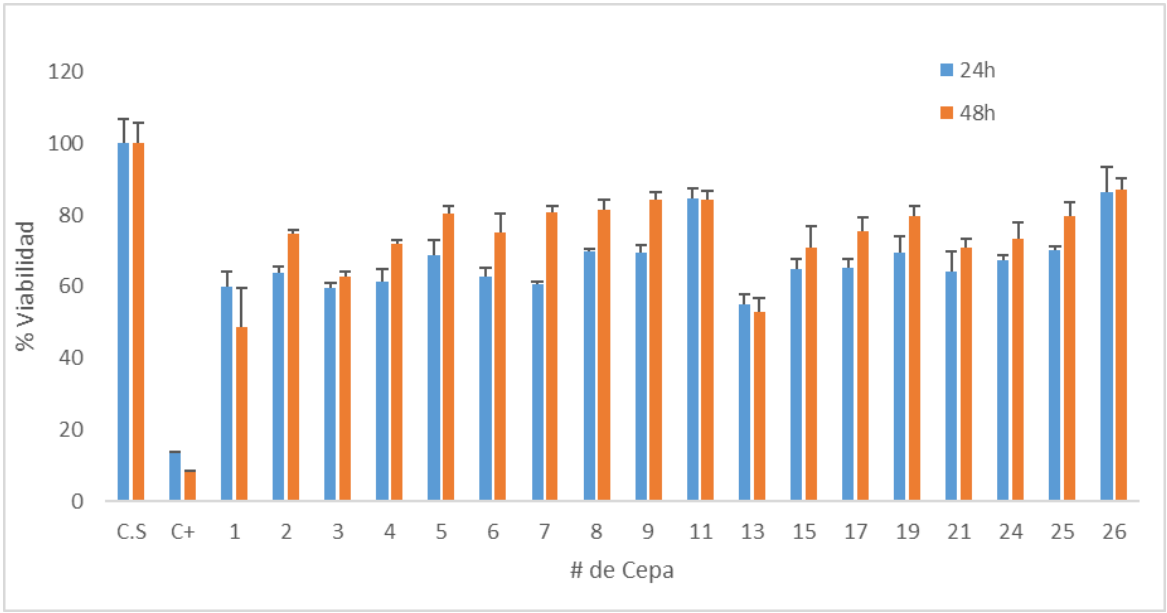

Figura 28. Prueba de citotoxicidad en línea celular T47D.

Las células de cáncer hepático (línea celular Hep62) disminuyeron su viabilidad frente a los extractos crudos de la cepa 1 al 58 %, seguido por la cepa 13 al 61,5 %. Los extractos crudos de todas las cepas excepto la 26, pierden actividad sobre las líneas celulares pasados a las 48 h.

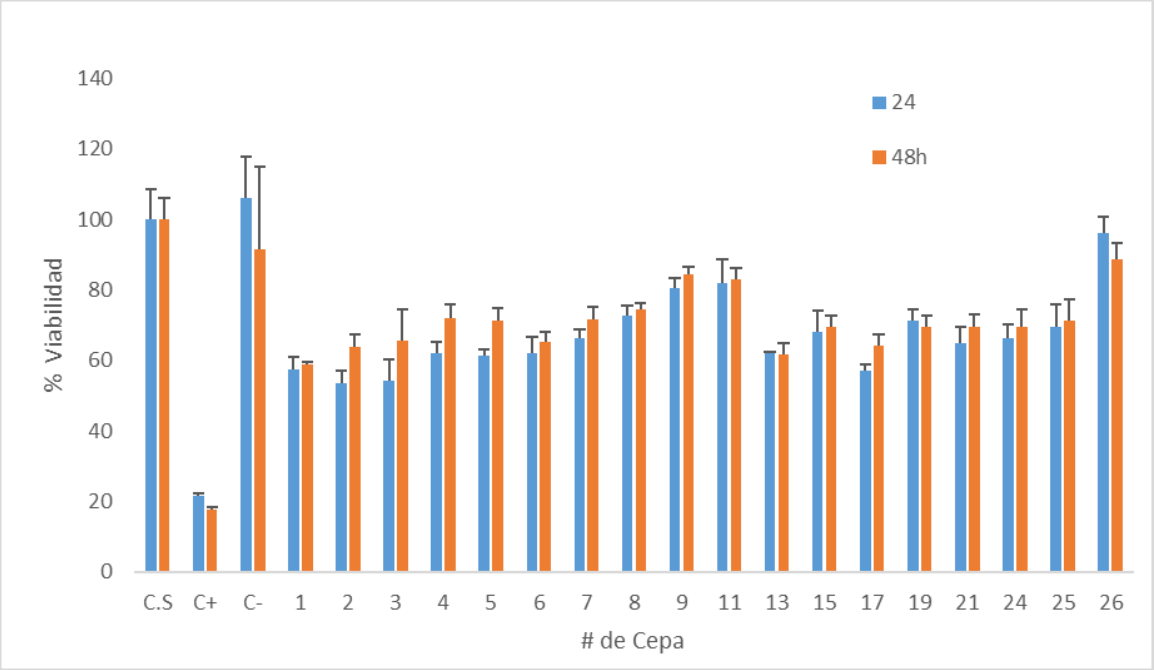

Figura 29. Prueba de citotoxicidad en línea celular Hep62.

La viabilidad de la línea celular RKO es afectada pasadas 24 h hasta disminuir a 63,8 % por el extracto de la cepa 7, para las 48 h los extractos crudos de todas las cepas pierden su actividad sobre la línea celular aumentando su viabilidad entre el 19 % y 41,7 %, llegando hasta un valor de 90,1 % de células viables (fig.30).

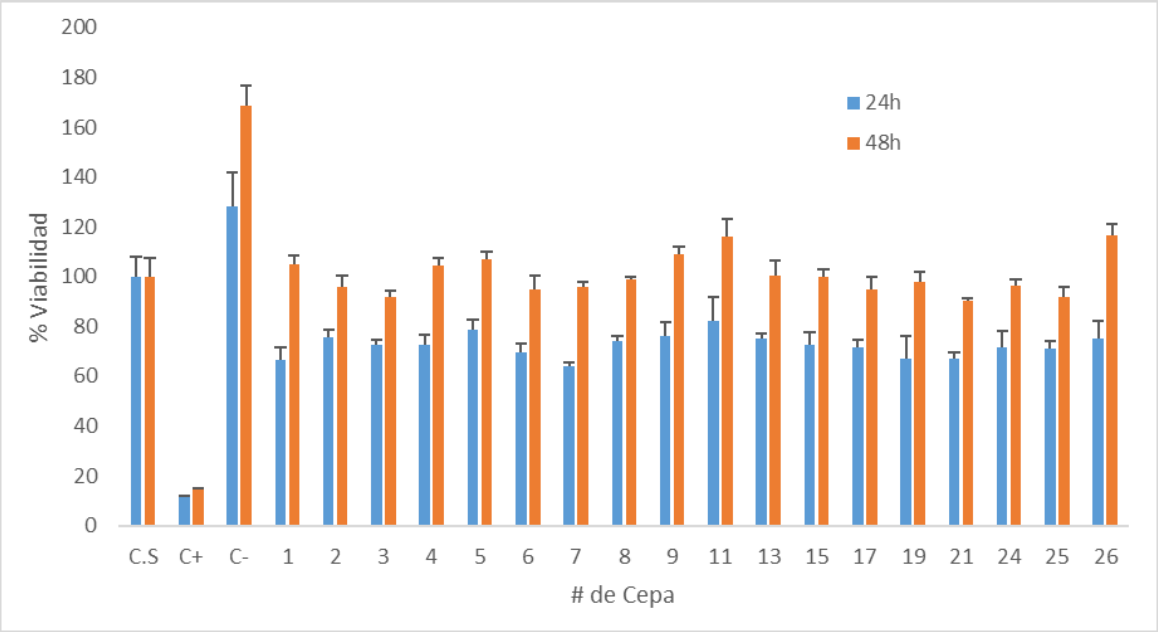

Figura 30. Prueba de citotoxicidad en línea celular RKO.

La línea celular HDMC, está compuesta por células no cancerígenas (sanas). Los extractos crudos afectaron un mínimo de 84 % por la cepa 11 y un máximo de 60,5 % por la cepa 1 cumplidas las 48 h (fig. 31).

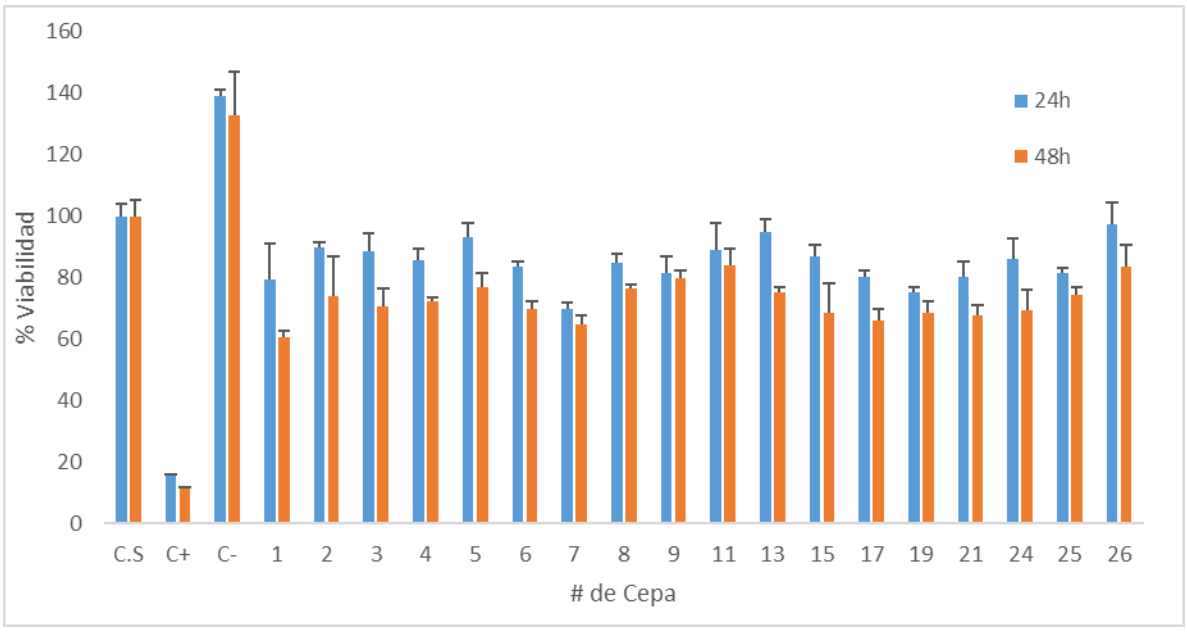

Figura 31. Prueba de citotoxicidad en línea celular HDMC.

5.5 Discusión

De manera general, el contenido de lípidos en los cultivos mostró diferencias significativas entre los tratamientos y se mantuvo con rangos de concentración similares comparando las tres cepas, con valores entre 4,85 µg / ml a 10.04 µg / ml en *Synechococcus* sp. (cepa 1); 4,46 µg / ml a 11,2 µg / ml en *Stanieria* sp. (cepa 7) y 4,8 µg / ml a 14,4 µg / ml en *Leptolyngbya* sp. 3. (cepa 3), destacando que el máximo de lípidos se dio en los tratamientos con un fotoperiodo de 12:12, viéndose disminuidos en aquellos tratamientos con exposiciones de luz más prolongados (fig. 24, 25 y 26). Ahora bien, este efecto de la reducción de lípidos con el aumento de la irradiancia ha sido evidenciado por Rosales *et al*. (2008), y lo aluden a la disminución de los galactolípidos enriquecidos con ácido eicosapentanoico, constituyentes de las membranas tilacoidales explicando que la captación de energía radiante necesita menos de estos componentes estructurales al incrementar la intensidad de luz. Sin embargo, otros microorganismos fotosintéticos como *Thalassiosira pseudonana* (Vásquez *et al*. 2013), *Dunaliella viridis* (Gordillo *et al*. 1998) y *Nannochloropsis oculata* (Martínez *et al*.2017) presentaron un efecto positivo con el aumento de la irradiancia, promoviendo la conversión de nutrientes en lípidos que a su vez está coordinada con la síntesis de carotenos almacenados en el citoplasma. La producción de estos pigmentos fotosintéticos por el incremento en la intensidad de luz tiene como función adicional el reducir el estrés fotooxidativo (Baker 2006).

Cabe resaltar que la intensidad de luz y el fotoperiodo inciden en el contenido bioquímico de los cyanoprokariotes variando entre géneros, incluso especies. Donde, cada cepa tiene un rango óptimo de crecimiento, favoreciendo el incremento de proteínas, carbohidratos y lípidos en función de la irradiancia y el tiempo de exposición a la luz (Jonte *et al*. 2003). Es así, que la concentración de proteínas en los organismos de estudio muestra que cada cepa se comporta de manera diferente frente a las condiciones de irradiancia y fotoperiodo a las cuales fueron sometidos. Donde, *Synechococcus* sp. (cepa 1) obtuvo como máximo de proteína 80 µg / ml a 55,5 µmol*m^{-2}*s^{-1} y 12 horas de luz (fig 24); *Stanieria* sp. (cepa 7) tuvo 52,8 µg / ml en condiciones de 111 µmol*m^{-2}*s^{-1} y 16:8 de fotoperiodo (fig. 25), y *Leptolyngbya* sp. 3. (cepa 3), alcanzó 79,2 µg / ml a 18,5 µmol*m^{-2}*s^{-1} y 12 horas de luz (fig. 26). La concentración proteica en cultivos de microorganismos fotosintéticos está relacionada con la asimilación de nitrógeno inorgánico, proceso dependiente a la luz, debido a que el ATP que realiza el transporte activo del nitrato es obtenido en la fotosíntesis

(Tischner & Lorenzen 1979; Rajasekaran *et al*. 1981). Resultados similares han sido reportados en otros cyanoprokariotes, *Synechocystis minúscula* bajo tres irradiancias (78, 156, 238 µmol*m^{-2}*s^{-1}) no presento diferencias en el contenido proteico (Jonte *et al*. 2003), Rosales *et* al. (2008) sometieron a *Synechococcus sp*. (cepa aislada de lago hipersalino en Maracaibo – Venezuela) a irradiancias de 78, 156, y 234 µmol*m^{-2}*s^{-1} obteniendo mayor proteína en la intensidad de luz más baja, Van Rijn & Shilo (1986) en *Spirulina* y *Oscillatoria* spp. sugieren el incremento en el contenido de proteínas es inversamente proporcional al aumento de la irradiancia. Loreto *et al*. (2003) en cultivos de *Anabaena* PCC 7120 a irradiancia de 78, 156 y 238 µmol*m^{-2}*s^{-1}. consiguió aumentar la concentración de proteína bajo condiciones de 156 µmol*m^{-2}*s^{-1}.

Ahora bien, Van Rijn & Shilo (1986) sugieren a partir de experimentos con *Spirulina* y *Oscillatoria* que el aumento en la intensidad de la luz y el tiempo de exposición en cultivos inducen a elevar la tasa de asimilación de carbono total, reflejado en un mayor porcentaje de carbohidratos. Pero, como se observó en el contenido de proteínas cada cepa tiene un comportamiento fisiológico diferente. De tal manera, el contenido celular frente a la acumulación de carbohidratos en función de la irradiancia y el fotoperiodo en los organismos de estudio presentan un óptimo en *Synechococcus* sp. (cepa 1) en el tratamiento 7 (tabla 5) con 72,5 µg / ml (fig. 24); *Stanieria* sp. (cepa 7) obtuvo 90,6 µg / ml (fig 25) bajo condiciones del tratamiento 4 (tabla 5) y *Leptolyngbya* sp. 3. (cepa 3) alcanzó 59 µg / ml (fig. 26) en el tratamiento 9 (tabla 5). Rosales *et al*. (2008) obtuvo una disminución del contenido en carbohidratos progresiva con el aumento de la irradiancia en una cepa de *Synechococcus* sp. Por otra parte, otros microorganismos fotosintéticos como *Thalassiosira pseudonana* y *Dunaliella salina* tuvieron un efecto positivo donde el incremento en la intensidad de la luz, aumentaron el contenido de carbohidratos (Vásquez *et al*. 2013 y Guevara *et al*. 2016).

Se encontró que la cepa 21 (tabla 4) identificada por caracteres morfológicos como *Leptolyngbya* sp. produce toxinas a una concentración de 0,3 de µg / l, siendo este un primer reporte para Colombia y el Caribe. Cabe destacar que la prueba no diferencia entre nodularinas y microcistinas, cianotoxinas que afectan el hígado y se sospecha que la exposición prolongada a concentraciones bajas podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de algunos tipos de cáncer (Stewart *et al*. 2009). Comúnmente, los cyanoprokariotes planctónicos y bentónicos pertenecientes a los géneros *Anabaena*,

Aphanizomenon, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Scytonema* y *Tolypothrix* son organismos potenciales en la producción de toxinas. Los ecosistemas marinos tienen a *Lyngbya*, *Schizothrix* y *Symploca*, que producen moléculas que causan dermatitis severa cuando se presenta un contacto directo con el organismo (Burja *et al*. 2001). También se han encontrado aplysiatoxina y debromoaplysiatoxina que actúan como promotores de tumores y activadores de la proteína quinasa C, Lyngbyatoxin que causa gastroenteritis en seres humanos. Especies del género *Trichodesmium* sp. forma florecimientos algales nocivos en los mares tropicales, liberando trichotoxinas, paliotoxinas (Arístegui *et al*. 2017).

El porcentaje de rendimientos de los extractos crudos son un factor importante para realizar los ensayos de actividad biológica sobre líneas celulares de cáncer, bacterias y hongos. Es así, que vemos en la tabla 6 la variación en la concentración de extractos por cada cepa. Donde *Stanieria* sp. obtuvo los menores rendimientos, organismo que los estudios son insuficientes y están dirigidos a la taxonomía y ecología (Tang *et al*. 2018; Wu *et al*. 2016). La actividad biológica de estos extractos crudos frente a bacterias Gram positivas fue negativo excepto por la cepa 3 que inhibido el crecimiento de *Bacillus subtilis*, en Gram negativas 11 cepas dieron positivo para bioactividad (tabla 7) y en *Candida albicans* hubo resultados positivos en todas las cepas excepto la numero 7. Los metabolitos secundarios de los cyanoprokariotes tiene como gran potencial de actividad biológica ser antibióticos (Carmichael 1992; Patterson *et al*. 1994; y Ostensvik *et al*. 1998). Torres (2004), realizo pruebas antimicrobianas con extractos crudos de *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina subsalsa, Lyngbya* sp. y *Limnothrix* sp. con resultados negativos en bacterias Gram positivas y negativas, en hongos utilizó *Candida albicans* la cual fue afectada por todos los extractos. Murakami *et al*. (1999) mostró que *Oscillatoria agardhii* produce metabolitos que actúan inhibiendo la tirosina. Sin embargo, una cepa diferente de esta misma especie no presentó actividad biológica, adicionalmente realizaron bioensayos en línea celulares de cáncer y bacterias Gram positivas y negativas obteniendo nula bioactividad como respuesta.

Finalmente, los extractos crudos presentaron actividad biológica sobre todas las líneas celulares disminuyendo el porcentaje de viabilidad de manera diferenciada (fig. 27 a 31). Esto muestra la plasticidad fisiológica que presentan cada uno de los cyanoprokariotes aislados. Es interesante ver que los extractos crudos pierden su efecto en pasadas las 24

horas en las líneas celulares de Hep62, RKO, T47D (fig. 28, 29 ,30). De acuerdo con los resultados se destacan la cepa 1 y 13 siendo los metabolitos secundarios con mayor bioactividad. Este estudio es un acercamiento exploratorio donde se observa el posible potencial de los cyanoprokariotes bentónicos asociados al arrecife de coral de Providencia y Santa Catalina Islas – Colombia, a partir de este acercamiento se puede diseñar nuevos estudios a nivel bioquímico y molecular.

La investigación en Colombia dirigida a esta temática es reciente, sobresale los trabajos como el de Quintana *et al*. (2014) donde a partir de *Oscillatoria nigroviridis* (organismos colectado en la Isla de Providencia – Colombia) identificó nuevos péptidos propuestos como almiramidas de la E a la H, junto con el aislamiento de almiramida D y B. Estos compuestos mostraron solo alta toxicidad contra la línea celular de fibroblastos gingivales y actividad leve contra las líneas celulares de cáncer de pulmón, cáncer de mama, carcinoma de cuello uterino y cáncer de próstata. Bayona (2014) con extractos de consorcios entre *Lyngbya majuscula* y *Oscillatoria margaritifera,* y de varias especies del género *Lyngbya* spp. obtuvo actividad biológica sobre líneas celulares de cáncer de mama y *Plasmodium falciparum*. Prato (2013) evaluó 10 consorcios de cyanoprokariotes pertenecientes al orden Oscillatoriales (*Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Symploca*) como inhibidores de quorum sensing teniendo resultados positivos en 7 de ellos.

5.6 Conclusiones

El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos varía de acuerdo con la cepa de estudio, sin embargo, tenemos que el fotoperiodo óptimo para obtener los mayores valores es bajo condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los resultados encontrados en las pruebas antimicrobianas, antifúngicas y actividad biológica en líneas celulares de cáncer, muestran la posibilidad de que los cyanoprokariotes aislados en este trabajo, presenten mayor bioactividad, empleando disolventes que fraccione los extractos por su polaridad.

5.7 Bibliografía

Andersen R. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Arístegui J, González A & Benavides M. 2017. Informe sobre la presencia de *Trichodesmium* spp. en aguas de Canarias, en el verano de 2017. Gobierno de Canarias.

Azevedo S. 1998. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. Medicina on Line. 1: 1 – 24.

Baker N. 2006. Photosynthesis and the environment. Kuwer Academic Publishers, Nueva York - EUA. 491.

Balaji S, Gopi K & Muthuvelan B. 2013. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bioplastics. Algal Res.; 2: 278 – 285.

Bayona L. 2014. Estudio químico y evaluación de la actividad citotóxica de metabolitos secundarios provenientes de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano. Trabajo de grado para optar al título de: Magister en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Bessa L, Buttachon S, Dethoup T, Martins R, Vasconcelos V, Kijjoa A & Martins P. 2016. Neofiscalin A and fiscalin C are potential novel indole alkaloid alternatives for the treatment of multidrug-resistant Gram-positive bacterial infections. FEMS Microbiology Letters. 363: 15.

Bio-Rad. 2006. Protein Assay. http://doi.org/10.1101/pdb.prodprot15.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248–254.

Briand J, Jacquet S, Bernard C & Humbert J. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. Veterinary Research. 34: 361 – 377.

Burja A, Banaigs B, Abou-Mansour E, Grant Burgess J, Wright P. 2001. Marine cyanobacteria a prolific source of natural products. Tetrahedron. 57: 9347- 9377.

Byreddy A, Gupta A, Barrow C & Puri M. 2016. A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. Journal of Microbiological Methods, 125, 28–32.

Carmichael W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. Journal of applied Bacteriology. 72: 445 – 459.

Chamorro G, Salazar M, Gomes K, Pereira C, Ceballos G, Fabila L. 2002 Actualización en la farmacología de Spirulina (Arthrospira), un alimento no convencional. Archivos. Latinoamericanos de Nutrición. Volumen 52(3): 232-240.

Cheng Y, Zheng Y, & VanderGheynst J. 2011. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. Lipids, 46(1), 95–103.

Codd G, Morrison L & Metcalf J. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. Toxicology and Applied Pharmacology. 203: 264 - 272.

Costa M, Garcia M, Costa J, Costa M, Ribeiro M, Fernandes M, Barros P, Barreiro A, Vasconcelos V y Martins R. 2014. Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese coast: High potential as a source of anticancer compounds. Marine Drugs, 12(1): 98–114.

Costa M, Rego A, Ramos V, Afonso T, Freitas S, Preto M, Lopes V, Vasconcelos V, Magalhães C y Leão P. 2016. The conifer biomarkers dehydroabietic and abietic acids are widespread in Cyanobacteria. Scientific Reports, 6(March), 23436. https://doi.org/10.1038/srep23436

DuBois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P & Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28(3): 350–356.

Freitas S, Martins R, Campos A, Azevedo J, Osório H, Costa M, Barros P, Vasconcelos V & Urbatzka R. 2016b. Insights into the potential of picoplanktonic marine cyanobacteria strains for cancer therapies Cytotoxic mechanisms against the RKO colon cancer cell line. Toxicon. 119: 140 - 151.

Freitas S, Martins R, Costa M, Leão P, Vitorino R, Vasconcelos V & Urbatzka R. 2016a. Hierridin B Isolated from a Marine Cyanobacterium Alters VDAC1, Mitochondrial Activity, and Cell Cycle Genes on HT-29 Colon Adenocarcinoma Cells. Marine Drugs. 2016; 14: 158.

Gerchakov S & Hatcher P. 1972. Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments. Limnology and Oceanography, 17(6): 938–943.

Gomes N, Bessa L, Buttachon S, Costa P, Buaruang J, Dethoup T, Silva A & Kijjoa A. 2014. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Tryptoquivalines and Meroditerpenes Isolated from the Marine-Derived Fungi *Neosartorya paulistensis*, *N. laciniosa*, *N. tsunodae*, and the Soil Fungi *N. fischeri* and *N. siamensis.* Marine Drugs. 12(2): 822 – 839.

Gordillo F, Goutx M, Figueroa F & Niell F. 1998. Effects of light intensity, CO2 and nitrogen supply on lipid class composition of Dunaliella viridis. Journal of Applied Phycology. 10: 135 - 144.

Guevara M, Pinto R, Villarroel J, Hernández E, Díaz R, Gotera B & Cortez R. 2016. Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de *Dunaliella salina*, proveniente de las salinas de Araya, Venezuela. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 28 (3): 494 – 501.

Jonte L, Rosales N, Briceño B & Morales E. 2003. La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minúscula* en cultivos discontinuos. Multiciencias. 3 (1): 7 – 14.

Mata T, Caetano N y Martins A. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(1): 217 - 232.

Martínez M, Sánchez R, Meza E, Ulloa R & Saldívar J. 2017. Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiésel. Revista Internacional de Contaminacion Ambiental. 33: 85 – 91.

Melgarejo L. (2010). Experimentos en fisiología vegetal. Bogotá, D.C. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Mi Y, Zhang J, He S, Yan X. 2017. New Peptides Isolated from Marine Cyanobacteria, an Overview over the Past Decade. Marine Drugs. 15(5):132.

Mishra S, Suh W, Farooq W, Moon M, Shrivastav A, Park M & Yang J. 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. Bioresource Technology, 155, 330–333.

Murakami M, Itou Y, Ishida K & Shin H. 1999. Prenylagaramides A and B, new cyclic peptides from two strains of Oscillatoria agardhii. Journal of Natural Products. 62: 752 - 755.

Ostensvik, O, Skulberg B & Hormazabal V. 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria - a comparative study of bacterial bioassays. Journal of Applied Microbiology. 84: 1117 - 1124.

Patterson G, Larsen L & Moore R. 1994. Bioactive Natural Products from blue-green algae. Journal of Applied Phycology. 6: 151 - 157.

Pinheiro C, Azevedo J, Campos A, Loureiro S & Vasconcelos V. 2013. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. Hydrobiologia. 705: 27 – 42.

Prasanna R. Sood A, Jaiswal P, Nayak S, Gupta V, Chaudhary V, Joshi M & Natarajan C. 2010. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (review). Applied Biochemistry and Microbiology. 46: 119 – 134.

Prato J. 2013. Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su posible papel ecológico. Trabajo de grado para optar al título de: Magister en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Puglisi M, Sneed J, Sharp K, Ritson R, Paul V. 2014. Marine chemical ecology in benthic environments. Natural Product Reports. 31:1510–1553.

Quintana J, Bayona L, Castellanos, Puyana M, Camargo P, Aristizábal F, Edwards C, Tabudravu J, Jaspars M & Ramos F. 2014. Almiramide D, cytotoxic peptide from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigroviridis.* Bioorganic & Medicinal Chemistry. 22 (24): 6789 – 6795.

Rajasekaran T, Somasekaran T & Venkatama L. 1981. Standardized procedures for pilot plant scale. Cultivation of *Spirulina platensis* under Indian condition. Archives of Hidrobiology 22: 114 – 126.

Ribeiro T, Lemos F, Preto M, Azevedo J, Sousa M, Leão P, Campos A, Linder S, Vitorino R, Vasconcelos V & Urbatzka R. 2017. Cytotoxicity of portoamides in human cancer cells and analysis of the molecular mechanisms of action. PLoS ONE. 12 (12): e0188817.

Rosales N, Guevara M, Lodeiros C & Morales E. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. Revista de Biología Tropical. Vol. 56 (2): 421- 429

Sánchez M, Bernal J, Rozo C, Rodríguez I. 2003. *Spirulina* (*Arthrospira*) an Edible Microorganism: A Review. Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. Vol. 8(1): 7-24

Śliwińska S, Maculewicza J, Felpeto A, Vasconcelos V & Latała A. 2017. Allelopathic activity of picocyanobacterium *Synechococcus* sp. on filamentous cyanobacteria. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 496: 16–21.

Stewart I, Carmichael W, Sadler R, McGregor G, Reardon K, Eaglesham G, Wickramasinghe W, Seawright A & Shaw G. 2009. Occupational and environmental hazard assessments for the isolation, purification and toxicity testing of cianobacterial toxins. Environmental Health. 8: 52.

Tang J, Jiangb D, Luob Y, Liang Y, Li L, Shah M & Daroch M. 2018. Potential new genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China. Algal Research 31: 14 – 20.

Thajuddin N. & Subramanian G. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. Current Science. 89: 50-57.

Tischner R. & Lorenzen H. 1979. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. Planta 146 (3): 287 – 292.

Torres A. 2004. Uso de cianobacterias en la producción de antibióticos. Ciencia y Mar. 43 – 52.

Van - Rijin J & Shilo M. 1986. Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and its effect on macromolecular synthesis. Applied and Environmental Microbiology. 52: 340 - 344.

Vásquez A, Guevara M, González M, Cortez R & Arredondo B. 2013. Growth and biochemical composition of Thalassiosira pseudonana (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) cultivated in semicontinuos system at different culture media and irradiances. Revista de Biología Tropical. 61 (3): 1003 – 1013.

Whitton B & Potts M. 2000. The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space. Springer Netherlands. Edición 1.

Wu Y, Yu G, Jiang H, Liu L & Zhao R. 2016. Role and lifestyle of calcified cyanobacteria (Stanieria) in Permian-Triassic boundary microbialites. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 448: 39 - 47.

Xipell P. 2011. Herramientas de optimización multiobjetivo. Aplicación a la generación de biocombustibles a partir de la cianobacteria *Synechocystis* sp. Pcc6803. Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales.

Zurawell R, Chen H, Burke J & Prepas E. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B - Critical Reviews. 8: 1 – 37.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La taxonomía de los cyanoprokariotes marinos del neotrópico debe tomar un enfoque holístico teniendo en cuenta caracteres moleculares, morfológicos, químicos, ecológicos y fisiológicos.

Las condiciones nutricionales óptimas para el desarrollo de cultivos de cyanoprokariotes es específico para cada cepa con lo cual, se encontró que los organismos de estudio tuvieron preferencias por los medios nutritivos ASNIII y BG11.

Se propone hacer curvas de crecimiento mediante el análisis de imágenes con un software de libre acceso como nueva herramienta alternativa de evaluación en cyanoprokariotes que crecen formando aglomerados, biofilm y no se distribuyen de manera uniforme en el medio nutritivo.

Las condiciones óptimas de irradiancia y fotoperiodo para el cultivo de cyanoprokariotes no solo dependen de la cepa utilizada (*Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp. 3 y *Stanieria* sp.), también de su finalidad, ya sea para producción de biomasa (peso seco), pigmentos fotosintéticos (clorofila a, carotenos, ficocianina, aloficocianina y ficoertitrina) y contenido bioquímico (carbohidratos, proteínas y lípidos). Puesto que las variables de intensidad de luz y tiempo de exposición donde se da un máximo de producción de biomasa no coinciden con la que se optimiza en la producción de los pigmentos, ficobiliproteínas, proteínas, carbohidratos y lípidos.

El estudio preliminar de los extractos crudos de los cyanoprokariotes aislados presentaron actividad biológica antimicrobiana, antifúngica y redujo la viabilidad a cinco líneas celulares de cáncer, mostrando el posible potencial que estos organismos tienen.

6.2 Recomendaciones

Colombia en comparación con otros países se encuentra relegado en la investigación de cyanoprokariotes, haciendo necesario el formar más profesionales en este tema y realizar alianzas con centros de investigaciones especialistas en el tema.

Para la identificación molecular de cada cepa se debe utilizar otros primers del 16s que para aumentar el tamaño de la secuencia y así asegurar la identidad de las especies. Los estudios fisiológicos modificando las condiciones de cultivos ahora deben ir dirigidos a la producción de metabolitos secundarios y su actividad biológica.

Los extractos crudos de los cyanoprokariotes de estudio mostraron actividad biológica sobre bacterias, hongos y células de cáncer, por tal motivo, se hace necesario los extractos sean fraccionados con diferentes solventes orgánicos para identificar las moléculas bioactivas.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO A

Para todas las pruebas estadísticas, valores en color rojo indican que estadísticamente hay diferencias significativas con una confianza del 95 %).

Pruebas estadísticas de cultivos en medio nutritivo sólido para verificación de los supuestos de aleatoriedad. Donde 1 es pruebas corridas arriba y debajo de la mediana, 2 corridas arriba y abajo; y 3 prueba de Box-Pierce; verificación de los supuestos de normalidad: pruebas de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov.y y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) con la prueba de Barlett. Análisis de varianza (ANOVA) a una vía y prueba de Kruskal-Wallis.

Muestra	Medio Nutritivo	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de Ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal-Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp. 1	BG11 Dulce	0,170903	0,334126	0,358129	0,957985	0,99996	P=0,0000256648	P < 0,05	P= 0,0000021053
	ASNIII	0,999999	0,999999	0,500105	0,552473	0,784385			
	ES	0,999999	0,999999	0,395224	0,305314	0,951893			
	Z8	0,999999	0,846824	0,316731	0,731814	0,977016			
	F/2	0,170903	0,176321	0,945766	0,518737	0,957997			
	BG11 Mar	0,648074	0,334126	0,817826	0,101978	0,781043			
	SN	0,648074	0,334126	0,817285	0,0884928	0,745292			
	CMM	0,648074	0,846824	0,601105	0,356981	0,975284			
Leptolyngbya sp. 1	BG11 Dulce	0,999999	0,846824	0,719247	0,00957731	0,532003	P=0,0535235	P = 0,4868	P= 0,211666
	ASNIII	0,999999	0,846824	0,502771	0,212779	0,851165			
	ES	0,648074	0,999999	0,4311	0,77168	0,982036			
	Z8	0,648074	0,999999	0,975476	0,0915719	0,579471			
	F/2	0,170903	0,334126	0,407325	0,71623	0,866555			
	BG11 Mar	0,648074	0,999999	0,209562	0,529229	0,984859			
	SN	0,170903	0,846824	0,659412	0,335461	0,910866			
	CMM	0,648074	0,999999	0,944381	0,895047	0,996254			
Stanieria sp.	BG11 Dulce	0,648074	0,846824	0,584398	0,963737	0,996255	P=0,00149947	P < 0,05	P= 0,0000585114
	ASNIII	0,999999	0,846824	0,465697	0,431595	0,958439			
	ES	0,648074	0,334126	0,579551	0,294718	0,575344			
	Z8	0,170903	0,334126	0,169544	0,350185	0,93682			
	F/2	0,648074	0,176321	0,922219	0,243173	0,598148			
	BG11 Mar	0,648074	0,334126	0,758979	0,562324	0,921895			
	SN	0,648074	0,846824	0,73174	0,0896237	0,614517			
	CMM	0,999999	0,999999	0,690869	0,773527	0,996256			
Leptolyngbya sp. 2	BG11 Dulce	0,999999	0,846824	0,461023	0,0771342	0,532029	P= 0,0644368	P < 0,05	P= 0,0000391718
	ASNIII	0,648074	0,999999	0,611761	0,668634	0,869286			
	ES	0,170903	0,846824	0,501216	0,981519	0,996255			
	Z8	0,999999	0,846824	0,581536	0,34251	0,904902			
	F/2	0,170903	0,846824	0,807997	0,225124	0,835838			
	BG11 Mar	0,648074	0,846824	0,625932	0,350645	0,747443			
	SN	0,999999	0,999999	0,670695	0,173754	0,827417			
	CMM	0,999999	0,999999	0,914791	0,0933023	0,588437			
Leptolyngbya sp. 3	BG11 Dulce	0,648074	0,999999	0,914342	0,0324416	0,532003	P=0,148124	P < 0,05	P = 0,0000654184
	ASNIII	0,170903	0,846824	0,536768	0,961749	0,996254			
	ES	0,999999	0,999999	0,979574	0,141731	0,532003			
	Z8	0,648074	0,846824	0,439356	0,896345	0,996256			
	F/2	0,170903	0,176321	0,553418	0,797617	0,994089			
	BG11 Mar	0,648074	0,846824	0,378444	0,85166	0,996254			
	SN	0,170903	0,334126	0,0976212	0,619411	0,977332			
	CMM	0,170903	0,846824	0,504369	0,349076	0,917426			

Prueba de Tukey, comparaciones entre los tratamientos.

Comparaciones múltiples					
Medios Nutritivos	***Synechococcus* sp.**	***Leptolyngbya* sp.1**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp.2**	***Leptolyngbya* sp.3**
	Tukey	**Tukey**	**Tukey**	**Tukey**	**Tukey**
ASNIII - BG11 Dulce	0,35068	-0,08085	0,10154	0,46364	0,27315
ASNIII - BG11 Mar	0,04105	-0,15489	0,03708	0,14116	-0,06137
ASNIII - CMM	0,07666	-0,03134	0,12656	0,18747	-0,08551
ASNIII - ES	0,43335	-0,05678	0,28883	0,43627	0,22050
ASNIII - F/2	0,18849	-0,14893	0,05163	0,19856	-0,05318
ASNIII - SN	0,21146	-0,09355	0,18467	0,24547	-0,08716
ASNIII - Z8	0,14982	-0,11568	0,08908	0,31288	0,07028
BG11 Dulce - BG11 Mar	-0,30963	-0,07404	-0,06446	-0,32249	-0,33451
BG11 Dulce – CMM	-0,27403	0,04950	0,02501	-0,27618	-0,35866
BG11 Dulce – ES	0,08266	0,02407	0,18729	-0,02738	-0,05264
BG11 Dulce - F/2	-0,16219	-0,06809	-0,04991	-0,26509	-0,32633
BG11 Dulce – SN	-0,13922	-0,01270	0,08312	-0,21817	-0,36031
BG11 Dulce - Z8	-0,20087	-0,03483	-0,01246	-0,15076	-0,20287
BG11 Mar - CMM	0,03561	0,12355	0,08947	0,04631	-0,02414
BG11 Mar - ES	0,39230	0,09812	0,25175	0,29511	0,28187
BG11 Mar - F/2	0,14744	0,00596	0,01455	0,05740	0,00818
BG11 Mar - SN	0,17041	0,06134	0,14758	0,10431	-0,02579
BG11 Mar - Z8	0,10877	0,03921	0,05199	0,17173	0,13165
CMM - ES	0,35669	-0,02543	0,16228	0,24880	0,30601
CMM - F/2	0,11184	-0,11759	-0,07492	0,01109	0,03233
CMM - SN	0,13480	-0,06221	0,05811	0,05800	-0,00165
CMM - Z8	0,07316	-0,08434	-0,03748	0,12542	0,15579
ES - F/2	-0,24485	-0,09216	-0,23720	-0,23771	-0,27369
ES - SN	-0,22189	-0,03678	-0,10417	-0,19080	-0,30766
ES - Z8	-0,28353	-0,05890	-0,19976	-0,12338	-0,15022
F/2 - SN	0,02296	0,05538	0,13303	0,04691	-0,03398
F/2 - Z8	-0,03868	0,03325	0,03744	0,11433	0,12347
SN - Z8	-0,06164	-0,02213	-0,09559	0,06741	0,15744

7.2 ANEXO B

Pruebas estadísticas para biomasa en peso seco

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,999999	0,794211	0,00407798	0,474797	0,0000181313	P < 0,05	0,00000385777
	2	0,999999	0,999999	0,912662	0,931652	0,989253			
	3	0,170903	0,176321	0,793665	0,573815	0,902841			
	4	0,999999	0,999999	0,991782	0,194397	0,835105			
	5	0,999999	0,846824	0,329521	0,34021	0,985752			
	6	0,648074	0,176321	0,451808	0,3164	0,921284			
	7	0,999999	0,846824	0,312080	0,469402	0,95565			
	8	0,170903	0,846824	0,515205	0,447716	0,987688			
	9	0,999999	0,846824	0,530984	0,172942	0,47938			
Stanieria sp.	1	0,648074	0,176321	0,828929	0,815525	0,987078	P < 0,05	P < 0,05	0,00000972232
	2	0,648074	0,999999	0,434963	0,910825	0,99786			
	3	0,648074	0,176321	0,595538	0,633594	0,951248			
	4	0,648074	0,999999	0,329102	0,355947	0,97551			
	5	0,999999	0,846824	0,903856	0,82735	0,95945			
	6	0,999999	0,999999	0,735693	0,464954	0,994329			
	7	0,648074	0,999999	0,887183	0,130381	0,60145			
	8	0,170903	0,999999	0,703380	0,962906	0,999069			
	9	0,170903	0,334126	0,849256	0,675356	0,840749			
Leptolyngbya sp.3	1	0,648074	0,999999	0,797158	0,271965	0,726897	0,0000049755	P < 0,05	0,00000108222
	2	0,999999	0,999999	0,870924	0,675401	0,974335			
	3	0,999999	0,846824	0,472103	0,566928	0,982837			
	4	0,999999	0,846824	0,251271	0,929965	0,998459			
	5	0,170903	0,334126	0,062110	0,111435	0,816588			
	6	0,648074	0,846824	0,478191	0,459413	0,924956			
	7	0,170903	0,999999	0,742024	0,95918	0,998977			
	8	0,999999	0,999999	0,487870	0,0557266	0,548193			
	9	0,999999	0,999999	0,925640	0,00655567	0,549651			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 – 2	-0,0828833	0,0117667	-0,0107833
1 – 3	-0,101467	-0,0074	-0,1709
1 – 4	-0,201167	-0,18665	-0,0218833
1 – 5	-0,166158	-0,160667	-0,124667
1 – 6	-0,278883	-0,0691	-0,2025
1 – 7	-0,0935667	-0,180483	-0,0379333
1 – 8	-0,238	-0,189167	-0,231017
1 – 9	-0,296233	-0,15075	-0,314317
2 – 3	-0,0185833	-0,0191667	-0,160117
2 – 4	-0,118283	-0,198417	-0,0111
2 – 5	-0,083275	-0,172433	-0,113883
2 – 6	-0,196	-0,0808667	-0,191717
2 – 7	-0,0106833	-0,19225	-0,02715
2 – 8	-0,155117	-0,200933	-0,220233
2 – 9	-0,21335	-0,162517	-0,303533
3 – 4	-0,0997	-0,17925	0,149017
3 - 5	-0,0646917	-0,153267	0,0462333
3 – 6	-0,177417	-0,0617	-0,0316
3 – 7	0,0079	-0,173083	0,132967
3 – 8	-0,136533	-0,181767	-0,0601167
3 – 9	-0,194767	-0,14335	-0,143417
4 – 5	0,0350083	0,0259833	-0,102783
4 – 6	-0,0777167	0,11755	-0,180617
4 – 7	0,1076	0,00616667	-0,01605
4 – 8	-0,0368333	-0,00251667	-0,209133
4 – 9	-0,0950667	0,0359	-0,292433
5 – 6	-0,112725	0,0915667	-0,0778333
5 – 7	0,0725917	-0,0198167	0,0867333
5 – 8	-0,0718417	-0,0285	-0,10635
5 – 9	-0,130075	0,00991667	-0,18965
6 – 7	0,185317	-0,111383	0,164567
6 – 8	0,0408833	-0,120067	-0,0285167
6 – 9	-0,01735	-0,08165	-0,111817
7 – 8	-0,144433	-0,00868333	-0,193083
7 – 9	-0,202667	0,0297333	-0,276383
8 – 9	-0,0582333	0,0384167	-0,0833

Clorofila a

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,999999	0,999999	0,790868	0,324095	0,826137	0,0000371872	P < 0,05	0,000023833
	2	0,170903	0,846824	0,846824	0,211769	0,752178			
	3	0,648074	0,999999	0,87446	0,466125	0,90821			
	4	0,170903	0,999999	0,881081	0,66764	0,985123			
	5	0,170903	0,846824	0,686646	0,573973	0,963008			
	6	0,648074	0,176321	0,427934	0,189294	0,820261			
	7	0,999999	0,846824	0,364672	0,340258	0,921466			
	8	0,999999	0,846824	0,381356	0,188545	0,719185			
	9	0,999999	0,846824	0,329199	0,977589	0,996449			
Stanieria sp.	1	0,170903	0,176321	0,364195	0,602016	0,979715	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
	2	0,170903	0,334126	0,497187	0,783858	0,953011			
	3	0,648074	0,846824	0,638705	0,324273	0,794155			
	4	0,648074	0,999999	0,216103	0,491457	0,734318			
	5	0,999999	0,846824	0,914984	0,930748	0,991047			
	6	0,999999	0,999999	0,43542	0,140968	0,934615			
	7	0,648074	0,999999	0,541585	0,600661	0,772258			
	8	0,170903	0,846824	0,805353	0,886797	0,996254			
	9	0,999999	0,846824	0,870043	0,711821	0,859761			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,999999	0,999999	0,864688	0,95761	0,99536	0,0031645800	0,0027	0,011585100
	2	0,648074	0,999999	0,749122	0,162883	0,903692			
	3	0,999999	0,846824	0,775852	0,158104	0,798812			
	4	0,648074	0,846824	0,450192	0,345107	0,961519			
	5	0,170903	0,334126	0,0325601	0,0121663	0,626535			
	6	0,648074	0,176321	0,413359	0,176056	0,890892			
	7	0,170903	0,0120332	0,676536	0,75491	0,99548			
	8	0,999999	0,999999	0,435318	0,773622	0,998165			
	9	0,999999	0,846824	0,313291	0,185097	0,962003			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 – 2	-0,0612646	0,248305	68,2581
1 – 3	-0,104092	-0,109697	-156,094
1 – 4	-0,991979	-4,51248	-255,843
1 - 5	-0,352832	-2,89202	-198,74
1 - 6	-1,05075	-0,510304	-332,261
1 - 7	-0,199982	-2,4093	-397,221
1 - 8	-0,289785	-2,6344	-237,776
1 - 9	-0,440741	-1,30337	-571,573
2 - 3	-0,0428274	-0,358002	-224,352
2 - 4	-0,930714	-4,76078	-324,101
2 - 5	-0,291567	-3,14033	-266,998
2 - 6	-0,989482	-0,758609	-400,519
2 - 7	-0,138717	-2,65761	-465,48
2 - 8	-0,228521	-2,8827	-306,034
2 - 9	-0,379476	-1,55167	-639,831
3 - 4	-0,887887	-4,40278	-99,7487
3 - 5	-0,24874	-2,78233	-42,6457
3 - 6	-0,946655	-0,400607	-176,167
3 - 7	-0,0958899	-2,29961	-241,128
3 - 8	-0,185693	-2,5247	-81,6819
3 - 9	-0,336649	-1,19367	-415,48
4 - 5	0,639147	1,62045	57,1029
4 - 6	-0,0587682	4,00217	-76,4181
4 - 7	0,791997	2,10317	-141,379
4 - 8	0,702193	1,87808	18,0667
4 - 9	0,551238	3,20911	-315,731
5 - 6	-0,697915	2,38172	-133,521
5 - 7	0,15285	0,482721	-198,482
5 - 8	0,0630466	0,257629	-39,0362
5 - 9	-0,0879089	1,58866	-372,834
6 - 7	0,850765	-1,899	-64,9609
6 - 8	0,760961	-2,12409	94,4848
6 - 9	0,610006	-0,793063	-239,313
7 - 8	-0,0898036	-0,225092	159,446
7 - 9	-0,240759	1,10594	-174,352
8 - 9	-0,150956	1,33103	-333,798

Carotenos

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,999999	0,999999	0,844221	P < 0,05	0,156356	0,0000434639	P < 0,05	0,000007602
	2	0,999999	0,999999	0,897321	0,727269	0,985912			
	3	0,648074	0,999999	0,831877	0,878371	0,958725			
	4	0,999999	0,999999	0,968949	0,0210264	0,334581			
	5	0,170903	0,999999	0,695893	0,200848	0,967124			
	6	0,999999	0,846824	0,745508	0,0634574	0,793826			
	7	0,999999	0,846824	0,326827	0,103568	0,750808			
	8	0,648074	0,176321	0,370578	0,45062	0,971761			
	9	0,999999	0,846824	0,402167	0,857582	0,914319			
Stanieria sp.	1	0,170903	0,176321	0,61511	0,721713	0,975606	P < 0,05	0,0005	0,00000482305
	2	0,999999	0,176321	0,509037	0,255301	0,532016			
	3	0,648074	0,176321	0,689719	0,352679	0,868479			
	4	0,999999	0,999999	0,594668	0,00894496	0,405128			
	5	0,648074	0,999999	0,793425	0,0117101	0,532001			
	6	0,648074	0,999999	0,372841	0,572993	0,846809			
	7	0,648074	0,999999	0,942177	0,018535	0,532029			
	8	0,170903	0,846824	0,896148	0,0140168	0,532002			
	9	0,999999	0,846824	0,978067	0,358465	0,973011			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,999999	0,999999	0,849237	0,914615	0,991238	P < 0,05	0,0001	0,000103322
	2	0,648074	0,999999	0,331481	0,0496873	0,775634			
	3	0,999999	0,846824	0,645316	0,960327	0,99998			
	4	0,648074	0,846824	0,458109	0,342864	0,855544			
	5	0,170903	0,334126	0,0485341	0,0626595	0,649026			
	6	0,648074	0,176321	0,445566	0,23244	0,967518			
	7	0,170903	0,0120332	0,510134	0,73793	0,984744			
	8	0,999999	0,999999	0,314224	0,204548	0,714104			
	9	0,648074	0,999999	0,786723	0,503889	0,899524			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	-0,116725	0,136253	0,00145633
1 - 3	-0,39861	0,134153	-0,0562817
1 - 4	-0,791482	-0,19801	-0,0992483
1 - 5	-0,797539	-0,0815485	-0,139024
1 - 6	-1,86172	0,096822	-0,209585
1 - 7	-0,104888	-0,0317223	-0,145752
1 - 8	-1,14362	-0,141548	-0,24084
1 - 9	-2,22294	0,047259	-0,104664
2 - 3	-0,281885	-0,00209917	-0,057738
2 - 4	-0,674757	-0,334263	-0,100705
2 - 5	-0,680814	-0,217801	-0,140481
2 - 6	-1,745	-0,0394307	-0,211041
2 - 7	0,0118363	-0,167975	-0,147209
2 - 8	-1,0269	-0,2778	-0,242297
2 - 9	-2,10621	-0,0889937	-0,10612
3 - 4	-0,392873	-0,332164	-0,0429667
3 - 5	-0,398929	-0,215702	-0,0827427
3 - 6	-1,46311	-0,0373315	-0,153303
3 - 7	0,293721	-0,165876	-0,0894705
3 - 8	-0,745012	-0,275701	-0,184559
3 - 9	-1,82433	-0,0868945	-0,0483819
4 - 5	-0,00605667	0,116462	-0,039776
4 - 6	-1,07024	0,294832	-0,110336
4 - 7	0,686594	0,166288	-0,0465038
4 - 8	-0,352139	0,056463	-0,141592
4 - 9	-1,43146	0,245269	-0,0054152
5 - 6	-1,06418	0,178371	-0,0705602
5 - 7	0,69265	0,0498262	-0,00672783
5 - 8	-0,346082	-0,059999	-0,101816
5 - 9	-1,4254	0,128808	0,0343608
6 - 7	1,75683	-0,128544	0,0638323
6 - 8	0,718101	-0,23837	-0,0312558
6 - 9	-0,361215	-0,049563	0,104921
7 - 8	-1,03873	-0,109825	-0,0950882
7 - 9	-2,11805	0,0789813	0,0410886
8 - 9	-1,07932	0,188807	0,136177

Ficocianina

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,999999	0,40224	0,644888	0,988617	0,0000000405803	P < 0,05	0,000013408
	2	0,170903	0,334126	0,333995	0,244911	0,837555			
	3	0,170903	0,846824	0,85042	0,484774	0,789177			
	4	0,648074	0,999999	0,901214	0,947025	0,99846			
	5	0,648074	0,176321	0,350951	0,763615	0,991897			
	6	0,999999	0,846824	0,308529	0,444085	0,974142			
	7	0,170903	0,846824	0,806058	0,945569	0,996256			
	8	0,648074	0,999999	0,973456	0,294284	0,949462			
	9	0,846824	0,846824	0,303608	0,363363	0,900461			
Stanieria sp.	1	0,999999	0,846824	0,544621	0,25792	0,532002	0,0000350585	0,421	0,133081
	2	0,999999	0,999999	0,674098	0,0241687	0,505906			
	3	0,648074	0,999999	0,910701	0,0778874	0,614701			
	4	0,648074	0,999999	0,935844	0,101243	0,866262			
	5	0,999999	0,999999	0,410741	0,0729312	0,842805			
	6	0,999999	0,846824	0,563682	0,225178	0,568528			
	7	0,999999	0,999999	0,966502	0,675956	0,878886			
	8	0,648074	0,999999	0,99637	0,79228	0,971922			
	9	0,648074	0,334126	0,659402	0,620579	0,977804			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,648074	0,999999	0,687263	0,566644	0,87557	0,288315	P < 0,05	0,00132827
	2	0,170903	0,334126	0,472355	0,266409	0,766148			
	3	0,999999	0,334126	0,866314	0,618992	0,99575			
	4	0,999999	0,846824	0,747906	0,089868	0,674869			
	5	0,170903	0,334126	0,0895828	0,151227	0,870371			
	6	0,170903	0,176321	0,389992	0,561431	0,989272			
	7	0,648074	0,176321	0,766378	0,874269	0,976224			
	8	0,170903	0,334126	0,296616	0,0810812	0,621963			
	9	0,999999	0,999999	0,973379	0,434879	0,993326			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	-0,000808943	-0,00141825	0,0167745
1 - 3	-0,00198555	-0,00262571	0,0239816
1 - 4	-0,0197737	-0,00183424	0,0164679
1 - 5	-0,0178368	-0,00204065	0,0303267
1 - 6	-0,0137832	-0,00047034	0,0289494
1 - 7	0,00886396	-0,00229675	0,0178106
1 - 8	-0,00115339	-0,00152033	0,0363607
1 - 9	-0,00620126	-0,00190786	0,0314916
2 - 3	-0,0011766	-0,00120747	0,00720711
2 - 4	-0,0189648	-0,000415989	-0,000306534
2 - 5	-0,0170279	-0,000622403	0,0135522
2 - 6	-0,0129743	0,000947907	0,0121749
2 - 7	0,0096729	-0,0008785	0,00103613
2 - 8	-0,000344444	-0,000102078	0,0195863
2 - 9	-0,00539232	-0,000489612	0,0147171
3 - 4	-0,0177882	0,000791479	-0,00751364
3 - 5	-0,0158512	0,000585064	0,00634514
3 - 6	-0,0117977	0,00215537	0,00496784
3 - 7	0,0108495	0,000328967	-0,00617097
3 - 8	0,000832159	0,00110539	0,0123792
3 - 9	-0,00421572	0,000717856	0,00751
4 - 5	0,00193692	-0,000206414	0,0138588
4 - 6	0,00599052	0,0013639	0,0124815
4 - 7	0,0286377	-0,000462511	0,00134267
4 - 8	0,0186203	0,000313911	0,0198928
4 - 9	0,0135724	-0,0000736225	0,0150236
5 - 6	0,0040536	0,00157031	-0,0013773
5 - 7	0,0267008	-0,000256097	-0,0125161
5 - 8	0,0166834	0,000520325	0,00603403
5 - 9	0,0116355	0,000132792	0,00116486
6 - 7	0,0226472	-0,00182641	-0,0111388
6 - 8	0,0126298	-0,00104999	0,00741132
6 - 9	0,00758193	-0,00143752	0,00254216
7 - 8	-0,0100173	0,000776423	0,0185501
7 - 9	-0,0150652	0,000388889	0,013681
8 - 9	-0,00504788	-0,000387534	-0,00486917

Aloficocianina

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,999999	0,726848	0,0896893	0,670391	P < 0,05	0,052	0,000031665
	2	0,170903	0,334126	0,37772	0,313403	0,826424			
	3	0,999999	0,846824	0,903426	0,335078	0,758948			
	4	0,648074	0,999999	0,812739	0,818966	0,983742			
	5	0,648074	0,176321	0,381552	0,644144	0,951852			
	6	0,999999	0,846824	0,430974	0,328009	0,885879			
	7	0,170903	0,334126	0,849286	0,874705	0,984463			
	8	0,170903	0,176321	0,871682	0,205808	0,69533			
	9	0,648074	0,334126	0,979013	P < 0,05	0,14903			
Stanieria sp.	1	0,999999	0,846824	0,439393	0,138335	0,745181	P < 0,05	0,5389	0,00120107
	2	0,540289	0,176321	0,512321	0,357259	0,622122			
	3	0,648074	0,999999	0,905045	0,0908806	0,825949			
	4	0,999999	0,846824	0,755756	0,131112	0,842883			
	5	0,999999	0,999999	0,41876	0,132089	0,86854			
	6	0,999999	0,846824	0,757264	0,0241287	0,602268			
	7	0,648074	0,999999	0,930799	0,874705	0,984463			
	8	0,999999	0,999999	0,925709	0,880679	0,99547			
	9	0,648074	0,846824	0,940115	0,000119817	0,485175			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,648074	0,176321	0,632286	0,909482	0,996254	0,466171	P < 0,05	0,000234506
	2	0,999999	0,846824	0,559479	0,599936	0,929597			
	3	0,999999	0,334126	0,868532	0,43353	0,987178			
	4	0,999999	0,846824	0,801995	0,376126	0,940564			
	5	0,170903	0,334126	0,116278	0,199166	0,88877			
	6	0,170903	0,176321	0,404955	0,70168	0,993992			
	7	0,648074	0,176321	0,676054	0,790084	0,968045			
	8	0,648074	0,846824	0,910084	0,0088275	0,509062			
	9	0,999999	0,999999	0,920575	0,327957	0,851485			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	0,0000352503	-0,000300059	0,0121522
1 - 3	-0,000818584	-0,00163186	0,0206455
1 - 4	-0,0074677	-0,00246727	0,00947823
1 - 5	-0,00998545	-0,00264096	0,0232264
1 - 6	-0,00555084	-0,000738997	0,0201137
1 - 7	0,00208307	-0,0025477	0,0100956
1 - 8	-0,000411446	-0,00167518	0,0238678
1 - 9	-0,0102041	-0,0104026	0,0202467
2 - 3	-0,000853835	-0,0013318	0,00849337
2 - 4	-0,00750295	-0,00216721	-0,00267394
2 - 5	-0,0100207	-0,0023409	0,0110742
2 - 6	-0,00558609	-0,000438938	0,00796155
2 - 7	0,00204782	-0,00224764	-0,00205654
2 - 8	-0,000446696	-0,00137512	0,0117156
2 - 9	-0,0102394	-0,0101026	0,00809454
3 - 4	-0,00664911	-0,000835408	-0,0111673
3 - 5	-0,00916686	-0,00100911	0,00258087
3 - 6	-0,00473225	0,000892861	-0,000531819
3 - 7	0,00290165	-0,000915841	-0,0105499
3 - 8	0,000407139	-0,0000433231	0,00322226
3 - 9	-0,00938555	-0,00877076	-0,00039883
4 - 5	-0,00251775	-0,000173697	0,0137482
4 - 6	0,00191686	0,00172827	0,0106355
4 - 7	0,00955077	-0,0000804327	0,000617404
4 - 8	0,00705625	0,000792085	0,0143896
4 - 9	-0,00273643	-0,00793535	0,0107685
5 - 6	0,00443461	0,00190197	-0,00311268
5 - 7	0,0120685	0,0000932645	-0,0131308
5 - 8	0,009574	0,000965782	0,000641396
5 - 9	-0,000218682	-0,00776165	-0,0029797
6 - 7	0,0076339	-0,0018087	-0,0100181
6 - 8	0,00513939	-0,000936185	0,00375408
6 - 9	-0,00465329	-0,00966362	0,000132989
7 - 8	-0,00249451	0,000872517	0,0137722
7 - 9	-0,0122872	-0,00785492	0,0101511
8 - 9	-0,00979268	-0,00872743	-0,00362109

Ficoeritrina

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,999999	0,775446	0,0812246	0,6098	0,0000104349	P < 0,05	0,000004949
	2	0,170903	0,999999	0,975672	0,744917	0,921973			
	3	0,999999	0,846824	0,911927	0,864788	0,989333			
	4	0,648074	0,999999	0,947669	0,843398	0,994795			
	5	0,648074	0,176321	0,458489	0,648511	0,995177			
	6	0,999999	0,846824	0,623766	0,340502	0,988821			
	7	0,170903	0,334126	0,821256	0,746729	0,977078			
	8	0,648074	0,176321	0,724869	0,490054	0,971656			
	9	0,999999	0,999999	0,778165	0,402517	0,964023			
Stanieria sp.	1	0,999999	0,846824	0,711041	0,719392	0,996254	0,0000522114	0,0075	0,000584644
	2	0,648074	0,176321	0,32084	0,472764	0,97945			
	3	0,999999	0,999999	0,938993	0,000371398	0,371265			
	4	0,170903	0,0120332	0,587754	0,468167	0,730713			
	5	0,999999	0,999999	0,397205	0,0763664	0,758281			
	6	0,999999	0,846824	0,636052	0,10555	0,540387			
	7	0,999999	0,999999	0,998634	0,276559	0,752925			
	8	0,648074	0,999999	0,994545	0,670593	0,835942			
	9	0,999999	0,999999	0,792821	0,0968115	0,823174			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,648074	0,999999	0,926743	0,135882	0,740368	0,590673	P < 0,05	0,00667283
	2	0,999999	0,846824	0,55361	0,940284	0,991403			
	3	0,648074	0,334126	0,933014	0,898113	0,996254			
	4	0,999999	0,999999	0,845501	0,112351	0,702552			
	5	0,170903	0,334126	0,239847	0,677129	0,996246			
	6	0,170903	0,176321	0,458693	0,409486	0,828082			
	7	0,999999	0,846824	0,924599	0,00600879	0,315			
	8	0,648074	0,846824	0,501566	0,571742	0,849103			
	9	0,648074	0,999999	0,390585	0,403405	0,934257			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	-0,000368239	-0,000077636	0,001025150
1 - 3	-0,000937376	-0,00235716	0,00455928
1 - 4	-0,00421428	-0,00407686	0,00323838
1 - 5	-0,00434067	-0,0037265	0,0053771
1 - 6	-0,00178714	-0,00119159	0,00464435
1 - 7	0,00031458	-0,0039161	0,00492883
1 - 8	-0,000688737	-0,00250173	0,00527393
1 - 9	-0,000583539	-0,00261956	0,00444605
2 - 3	-0,000569137	-0,00227952	0,00353413
2 - 4	-0,00384604	-0,00399922	0,00221323
2 - 5	-0,00397243	-0,00364886	0,00435195
2 - 6	-0,0014189	-0,00111395	0,0036192
2 - 7	0,00068282	-0,00383846	0,00390369
2 - 8	-0,000320497	-0,0024241	0,00424878
2 - 9	-0,000215299	-0,00254193	0,0034209
3 - 4	-0,0032769	-0,0017197	-0,0013209
3 - 5	-0,00340329	-0,00136934	0,000817824
3 - 6	-0,000849766	0,00116557	8,50759E-05
3 - 7	0,00125196	-0,00155894	0,000369558
3 - 8	0,00024864	-0,00014458	0,000714651
3 - 9	0,000353837	-0,00026241	-0,000113228
4 - 5	-0,000126389	0,000350362	0,00213872
4 - 6	0,00242714	0,00288527	0,00140597
4 - 7	0,00452886	0,000160764	0,00169045
4 - 8	0,00352554	0,00157513	0,00203555
4 - 9	0,00363074	0,0014573	0,00120767
5 - 6	0,00255352	0,00253491	-0,000732749
5 - 7	0,00465525	-0,0001896	-0,000448266
5 - 8	0,00365193	0,00122476	-0,000103173
5 - 9	0,00375713	0,00110693	-0,000931053
6 - 7	0,00210172	-0,00272451	0,000284482
6 - 8	0,00109841	-0,00131015	0,000629575
6 - 9	0,0012036	-0,00142798	-0,000198304
7 - 8	-0,00100332	0,00141436	0,000345093
7 - 9	-0,000898119	0,00129653	-0,000482787
8 - 9	0,000105198	-0,00011783	-0,00082788

Ficobiliproteínas totales

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,999999	0,465169	0,435984	0,959655	0,0000000163688	P <0,05	0,000012889
	2	0,170903	0,334126	0,446455	0,139703	0,637386			
	3	0,999999	0,846824	0,910453	0,535178	0,83846			
	4	0,648074	0,999999	0,885499	0,951657	0,998483			
	5	0,648074	0,176321	0,351226	0,792624	0,958117			
	6	0,999999	0,846824	0,355763	0,45215	0,946506			
	7	0,999999	0,846824	0,925739	0,346619	0,834948			
	8	0,648074	0,999999	0,948085	0,237751	0,833226			
	9	0,999999	0,999999	0,468843	0,418194	0,995868			
Stanieria sp.	1	0,999999	0,999999	0,496555	0,601475	0,904864	0,0000175342	0,0127	0,00192613
	2	0,999999	0,846824	0,781941	0,405285	0,96939			
	3	0,648074	0,999999	0,912183	0,118545	0,779107			
	4	0,999999	0,846824	0,564925	0,423802	0,877097			
	5	0,999999	0,999999	0,40567	0,0861536	0,870726			
	6	0,999999	0,846824	0,641193	0,0929995	0,544093			
	7	0,999999	0,999999	0,980437	0,327962	0,749709			
	8	0,648074	0,999999	0,99804	0,777657	0,929327			
	9	0,999999	0,846824	0,618968	0,663221	0,862248			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,648074	0,176321	0,660053	0,434247	0,914437	0,26563	P <0,05	0,000709848
	2	0,999999	0,846824	0,549212	0,407572	0,813905			
	3	0,999999	0,334126	0,881399	0,627705	0,994912			
	4	0,999999	0,846824	0,801322	0,237316	0,914744			
	5	0,170903	0,334126	0,103301	0,197067	0,897402			
	6	0,170903	0,176321	0,395568	0,64833	0,992055			
	7	0,648074	0,176321	0,649255	0,868677	0,998415			
	8	0,170903	0,334126	0,640201	0,0674648	0,720513			
	9	0,999999	0,999999	0,989111	0,585999	0,996738			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	-0,00114193	-0,000628927	0,0329007
1 - 3	-0,00374151	-0,00609034	0,0521353
1 - 4	-0,0314557	-0,00861395	0,0321335
1 - 5	-0,0321629	-0,0086437	0,0618792
1 - 6	-0,0211212	-0,00263651	0,0566564
1 - 7	0,0112616	-0,00899613	0,035784
1 - 8	-0,00225357	-0,00593283	0,0684514
1 - 9	-0,00858426	-0,00645001	0,0591333
2 - 3	-0,00259958	-0,00546142	0,0192346
2 - 4	-0,0303138	-0,00798503	-0,000767245
2 - 5	-0,031021	-0,00801478	0,0289784
2 - 6	-0,0199792	-0,00200759	0,0237557
2 - 7	0,0124035	-0,00836721	0,00288328
2 - 8	-0,00111164	-0,00530391	0,0355507
2 - 9	-0,00744233	-0,00582109	0,0262325
3 - 4	-0,0277142	-0,00252361	-0,0200019
3 - 5	-0,0284214	-0,00255336	0,00974383
3 - 6	-0,0173797	0,00345383	0,0045211
3 - 7	0,0150031	-0,00290579	-0,0163513
3 - 8	0,00148794	0,000157509	0,0163161
3 - 9	-0,00484275	-0,000359671	0,00699794
4 - 5	-0,000707221	-0,0000297488	0,0297457
4 - 6	0,0103345	0,00597744	0,0245229
4 - 7	0,0427173	-0,00038218	0,00365053
4 - 8	0,0292021	0,00268112	0,0363179
4 - 9	0,0228714	0,00216394	0,0269998
5 - 6	0,0110417	0,00600719	-0,00522273
5 - 7	0,0434245	-0,000352431	-0,0260952
5 - 8	0,0299093	0,00271087	0,00657225
5 - 9	0,0235787	0,00219369	-0,00274589
6 - 7	0,0323828	-0,00635962	-0,0208724
6 - 8	0,0188676	-0,00329632	0,011795
6 - 9	0,0125369	-0,0038135	0,00247684
7 - 8	-0,0135152	0,0030633	0,0326674
7 - 9	-0,0198459	0,00254612	0,0233493
8 - 9	-0,00633069	-0,00051718	-0,00931814

7.3 ANEXO C

Proteínas

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,334126	0,472256	0,229007	0,853523	0,417439	P < 0,05	0,000000401551
	2	0,999999	0,999999	0,804861	0,192636	0,965574			
	3	0,648074	0,999999	0,857975	0,187265	0,869948			
	4	0,648074	0,176321	0,801636	0,625917	0,983927			
	5	0,170903	0,999999	0,636382	0,176469	0,825898			
	6	0,999999	0,999999	0,625194	0,54206	0,766241			
	7	0,648074	0,176321	0,481365	0,665396	0,992315			
	8	0,170903	0,846824	0,428135	0,59902	0,985177			
	9	0,999999	0,846824	0,702796	0,300035	0,86434			
Stanieria sp.	1	0,648074	0,999999	0,579312	0,419831	0,894862	0,0237801	P < 0,05	0,00000520385
	2	0,648074	0,176321	0,747931	0,334294	0,842183			
	3	0,999999	0,846824	0,789101	0,196127	0,866526			
	4	0,648074	0,176321	0,418384	0,194777	0,781768			
	5	0,170903	0,334126	0,0534613	0,0324188	0,656104			
	6	0,170903	0,176321	0,397698	0,118569	0,891143			
	7	0,648074	0,846824	0,587708	0,622687	0,986726			
	8	0,170903	0,334126	0,27559	0,0453659	0,469532			
	9	0,999999	0,999999	0,920513	0,0211667	0,589881			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,648074	0,999999	0,579312	0,419831	0,894862	0,000141221	0,037	0,0116061
	2	0,648074	0,176321	0,747931	0,334294	0,842183			
	3	0,999999	0,846824	0,789101	0,196127	0,866526			
	4	0,648074	0,176321	0,418384	0,194777	0,781768			
	5	0,170903	0,334126	0,0534613	0,0324188	0,656104			
	6	0,170903	0,176321	0,397698	0,118569	0,891143			
	7	0,648074	0,846824	0,587708	0,622687	0,986726			
	8	0,170903	0,334126	0,27559	0,0453659	0,469532			
	9	0,999999	0,999999	0,920513	0,0211667	0,589881			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	0,0176708	0,0100965	0,00301767
1 - 3	0,0138496	-0,00428661	0,0212915
1 - 4	-0,0363405	-0,0210477	0,00916051
1 - 5	-0,0260159	-0,0263489	0,0212391
1 - 6	0,00269781	-0,00856012	0,0197997
1 - 7	0,00786272	-0,0211237	0,00432594
1 - 8	0,00754024	-0,0295501	0,0212338
1 - 9	0,00100676	-0,0298516	0,0169026
2 - 3	-0,00382125	-0,0143831	0,0182738
2 - 4	-0,0540113	-0,0311441	0,00614283
2 - 5	-0,0436867	-0,0364454	0,0182214
2 - 6	-0,014973	-0,0186566	0,016782
2 - 7	-0,00980809	-0,0312202	0,00130827
2 - 8	-0,0101306	-0,0396466	0,0182161
2 - 9	-0,016664	-0,0399481	0,013885
3 - 4	-0,0501901	-0,0167611	-0,012131
3 - 5	-0,0398655	-0,0220623	-0,0000524357
3 - 6	-0,0111517	-0,0042735	-0,00149179
3 - 7	-0,00598684	-0,0168371	-0,0169656
3 - 8	-0,00630932	-0,0252635	-0,0000576795
3 - 9	-0,0128428	-0,025565	-0,00438886
4 - 5	0,0103246	-0,00530124	0,0120785
4 - 6	0,0390383	0,0124875	0,0106392
4 - 7	0,0442032	-0,0000760317	-0,00483457
4 - 8	0,0438808	-0,00850244	0,0120733
4 - 9	0,0373473	-0,00880394	0,00774212
5 - 6	0,0287138	0,0177888	-0,00143936
5 - 7	0,0338787	0,00522521	-0,0169131
5 - 8	0,0335562	-0,0032012	-0,00000524383
5 - 9	0,0270227	-0,0035027	-0,00433643
6 - 7	0,00516491	-0,0125636	-0,0154738
6 - 8	0,00484243	-0,02099	0,00143411
6 - 9	-0,00169105	-0,0212915	-0,00289707
7 - 8	-0,000322479	-0,00842641	0,0169079
7 - 9	-0,00685596	-0,00872791	0,0125767
8 - 9	-0,00653348	-0,000301505	-0,00433118

Carbohidratos

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,846824	0,333342	0,757891	0,995136	0,000206799	P < 0,05	0,0000568404
	2	0,999999	0,846824	0,729714	0,87171	0,994457			
	3	0,999999	0,846824	0,957641	0,783763	0,96378			
	4	0,648074	0,999999	0,814023	0,829381	0,940842			
	5	0,999999	0,957641	0,320179	0,0932447	0,773744			
	6	0,999999	0,999999	0,863615	0,312984	0,930516			
	7	0,999999	0,846824	0,35121	0,37384	0,938589			
	8	0,648074	0,176321	0,608292	0,292336	0,806393			
	9	0,648074	0,999999	0,491604	0,920197	0,983591			
Stanieria sp.	1	0,648074	0,999999	0,835303	0,967191	0,996099	0,000000215931	P < 0,05	0,000011304
	2	0,999999	0,846824	0,555703	0,893629	0,999522			
	3	0,648074	0,999999	0,520397	0,422289	0,923023			
	4	0,170903	0,999999	0,76387	0,682045	0,997435			
	5	0,648074	0,999999	0,722598	0,084273	0,766939			
	6	0,648074	0,999999	0,494638	0,00585464	0,449054			
	7	0,648074	0,999999	0,780478	0,0896991	0,772331			
	8	0,999999	0,846824	0,538059	0,82977	0,945672			
	9	0,999999	0,846824	0,427112	0,384157	0,815412			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,648074	0,999999	0,572818	0,295721	0,828744	0,00000432202	0,0001	0,001978630
	2	0,170903	0,846824	0,865753	0,179933	0,844726			
	3	0,648074	0,176321	0,43234	0,374646	0,85862			
	4	0,999999	0,846824	0,357452	0,133475	0,830207			
	5	0,170903	0,334126	0,0955527	0,379539	0,965744			
	6	0,648074	0,334126	0,669319	0,0816423	0,804768			
	7	0,999999	0,999999	0,5526	0,719295	0,954555			
	8	0,999999	0,846824	0,52556	0,128982	0,738487			
	9	0,648074	0,846824	0,71602	0,0150336	0,57604			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	-0,0368974	0,00821563	-0,0178621
1 - 3	-0,021137	-0,0227943	-0,00857768
1 - 4	0,000426083	-0,0688842	-0,0113319
1 - 5	-0,0317491	-0,0606262	0,00418597
1 - 6	-0,0277448	-0,00349105	-0,00658145
1 - 7	-0,0568879	-0,0521657	-0,00388606
1 - 8	-0,0311841	-0,0464736	-0,0239779
1 - 9	-0,0404802	-0,0175989	-0,032363
2 - 3	0,0157604	-0,0310099	0,00928437
2 - 4	0,0373234	-0,0770998	0,00653013
2 - 5	0,0051483	-0,0688418	0,022048
2 - 6	0,00915254	-0,0117067	0,0112806
2 - 7	-0,0199906	-0,0603814	0,013976
2 - 8	0,00571328	-0,0546893	-0,00611582
2 - 9	-0,00358286	-0,0258145	-0,0145009
3 - 4	0,0215631	-0,0460899	-0,00275424
3 - 5	-0,0106121	-0,0378319	0,0127637
3 - 6	-0,00660782	0,0193032	0,00199623
3 - 7	-0,0357509	-0,0293715	0,00469162
3 - 8	-0,0100471	-0,0236794	-0,0154002
3 - 9	-0,0193432	0,00519539	-0,0237853
4 - 5	-0,0321751	0,008258	0,0155179
4 - 6	-0,0281709	0,0653931	0,00475047
4 - 7	-0,057314	0,0167185	0,00744586
4 - 8	-0,0316102	0,0224105	-0,012646
4 - 9	-0,0409063	0,0512853	-0,0210311
5 - 6	0,00400424	0,0571351	-0,0107674
5 - 7	-0,0251389	0,00846045	-0,00807203
5 - 8	0,000564972	0,0141525	-0,0281638
5 - 9	-0,00873117	0,0430273	-0,036549
6 - 7	-0,0291431	-0,0486747	0,00269539
6 - 8	-0,00343927	-0,0429826	-0,0173964
6 - 9	-0,0127354	-0,0141078	-0,0257815
7 - 8	0,0257039	0,00569209	-0,0200918
7 - 9	0,0164077	0,0345669	-0,0284769
8 - 9	-0,00929614	0,0288748	-0,00838512

Lípidos

Muestra	Tratamiento	Aleatoriedad			Prueba de Shapiro	Bondad de ajuste K.S	Prueba de Barlett	F	Kruskal - Wallis
		1	2	3					
Synechococcus sp.	1	0,648074	0,999999	0,675027	0,658973	0,87469	0,018939	P < 0,05	0,00000921969
	2	0,170903	0,999999	0,758573	0,571477	0,918435			
	3	0,170903	0,176321	0,593525	0,889301	0,99868			
	4	0,999999	0,334126	0,1569	0,777668	0,879659			
	5	0,170903	0,334126	0,46312	0,462716	0,995827			
	6	0,999999	0,999999	0,839012	0,479359	0,928165			
	7	0,648074	0,176321	0,443759	0,383125	0,974462			
	8	0,170903	0,334126	0,133045	0,434056	0,856259			
	9	0,999999	0,846824	0,290674	0,583179	0,898618			
Stanieria sp.	1	0,648074	0,176321	0,55723	0,856148	0,999955	0,222223	P < 0,05	0,00000934133
	2	0,999999	0,846824	0,573902	0,868839	0,982303			
	3	0,648074	0,176321	0,391359	0,831002	0,984035			
	4	0,648074	0,846824	0,709222	0,501854	0,875319			
	5	0,648074	0,846824	0,307795	0,510109	0,956826			
	6	0,648074	0,999999	0,535372	0,381814	0,661205			
	7	0,999999	0,846824	0,6731	0,102406	0,690985			
	8	0,999999	0,846824	0,769214	0,0411887	0,497402			
	9	0,170903	0,334126	0,373318	0,693497	0,978628			
Leptolyngbya sp. 3	1	0,170903	0,846824	0,416074	0,23881	0,947191	0,0344644	P < 0,05	0,000299441
	2	0,999999	0,999999	0,976333	0,70406	0,996958			
	3	0,648074	0,999999	0,587204	0,73958	0,975668			
	4	0,648074	0,176321	0,78145	0,830868	0,942258			
	5	0,170903	0,334126	0,865504	0,0222795	0,456067			
	6	0,648074	0,176321	0,573689	0,30317	0,924125			
	7	0,170903	0,176321	0,475231	0,336094	0,900462			
	8	0,170903	0,846824	0,649566	0,811978	0,993103			
	9	0,999999	0,999999	0,923572	0,719744	0,964754			

Comparaciones múltiples			
Tratamientos	**Prueba de Tukey**		
	***Synechococcus* sp.**	***Stanieria* sp.**	***Leptolyngbya* sp. 3**
1 - 2	0,00206989	-0,000429553	0,00256225
1 - 3	0,00252708	-0,00143687	0,00395892
1 - 4	-0,00197946	-0,0067372	0,000415738
1 - 5	0,00120828	-0,00656388	-0,000385593
1 - 6	-0,000429553	-0,00160768	-0,000800074
1 - 7	0,00136151	-0,00220002	-0,00564197
1 - 8	0,00321663	-0,00155744	0,000419505
1 - 9	0,00296668	-0,00325305	-0,00141426
2 - 3	0,000457185	-0,00100732	0,00139668
2 - 4	-0,00404936	-0,00630765	-0,00214651
2 - 5	-0,000861618	-0,00613432	-0,00294784
2 - 6	-0,00249945	-0,00117813	-0,00336232
2 - 7	-0,000708386	-0,00177046	-0,00820422
2 - 8	0,00114673	-0,00112789	-0,00214274
2 - 9	0,000896787	-0,0028235	-0,00397651
3 - 4	-0,00450654	-0,00530034	-0,00354319
3 - 5	-0,0013188	-0,00512701	-0,00434452
3 - 6	-0,00295663	-0,000170816	-0,004759
3 - 7	-0,00116557	-0,000763148	-0,00960089
3 - 8	0,000689546	-0,000120576	-0,00353942
3 - 9	0,000439602	-0,00181618	-0,00537318
4 - 5	0,00318774	0,000173329	-0,00080133
4 - 6	0,00154991	0,00512952	-0,00121581
4 - 7	0,00334097	0,00453719	-0,00605771
4 - 8	0,00519609	0,00517976	0,00000376767
4 - 9	0,00494614	0,00348415	-0,00183
5 - 6	-0,00163783	0,00495619	-0,000414481
5 - 7	0,000153233	0,00436386	-0,00525638
5 - 8	0,00200835	0,00500643	0,000805098
5 - 9	0,00175841	0,00331083	-0,00102867
6 - 7	0,00179106	-0,000592331	-0,00484189
6 - 8	0,00364618	0,0000502402	0,00121958
6 - 9	0,00339623	-0,00164536	-0,000614186
7 - 8	0,00185512	0,000642571	0,00606147
7 - 9	0,00160517	-0,00105303	0,00422771
8 - 9	-0,000249945	-0,0016956	-0,00183377