UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE SYNECHOCOCCALES Y OSCILLATORIALES (CYANOBACTERIA) COLOMBIANAS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2023

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE SYNECHOCOCCALES Y OSCILLATORIALES (CYANOBACTERIA) COLOMBIANAS

Mohamed Toufic Darwich Cedeño

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

Doctor en Ciencias - Biología

Director:

Dr. Sc. Luis Carlos Montenegro Ruiz

Línea de Investigación:

Biotecnología

Grupo de Investigación:

Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2023

"…a saber, que la naturaleza o Dios es un ser del que se predican infinitos atributos y que contiene en sí todas las esencias de las cosas creadas, es necesario que de todo eso surja en el pensamiento una idea infinita, que contenga en sí objetivamente toda la naturaleza, tal como es realmente en sí."

Baruch Spinoza.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Mohamed Toufic Darwich Cedeño

Fecha DD/MM/2023

Resumen

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE SYNECHOCOCCALES Y OSCILLATORIALES (CYANOBACTERIA) COLOMBIANAS

Las cianobacterias son de los organismos más antiguos del planeta, por tanto, han soportado múltiples presiones ambientales y biológicas que han impulsado a la aparición de moléculas que han garantizado su supervivencia. Partiendo de lo anterior, se buscó realizar una caracterización biotecnológica de las cianobacterias de la Colección de Algas y Cianobacterias LAUN, de la Universidad Nacional de Colombia.

Se identificaron las cepas mediante análisis moleculares encontrando 7 posibles géneros nuevos. Se analizó la producción de metabolitos primarios, teniendo que la cepa LAUN 81 (*Synechoccocales Cyanobacteria*) presenta la mayor concentración de proteína (19.04% de proteína soluble), la cepa LAUN 34 (*Pleurocapsa sp.*) presenta la mayor concentración de carbohidratos (11.73% de carbohidratos solubles) y la cepa LAUN 74 (*Synechoccocales Cyanobacteria*) presenta la mayor concentración de lípidos (40.5% de lípidos del peso total de biomasa).

Por otra parte, la cepa LAUN 71 (*Leptolyngbya sp.*) presentó los mejores porcentajes de remoción de contaminantes en agua residual sintética, 77.5% de nitratos y 98% de fosfatos, alcanzó un 85.40% de disminución de la DQO y 94.5% de la DBO_5.

Finalmente, se realizó el fraccionamiento por HPLC de extractos metanólicos de los géneros representativos de las cepas LAUN y se probaron las fracciones contra células cancerígenas de cáncer colorectal (HCT116) y osteosarcoma (MG063), teniendo que la fracción “D” de LAUN33 (*Baaleninema sp*.) y la fracción “A” de LAUN 74 la mayor toxicidad con rendimientos de 33.18% y 34.32% de supervivencia celular respectivamente, contra la línea HCT116 y las fracciones E y F de la cepa LAUN33, la fracción H de LAUN 55 (*Synechoccocales Cyanobacteria*) y la fracción F de LAUN74 presentaron la mayor toxicidad con rendimientos de 39.28%, 38.94%, 38.28% y 38.42% de supervivencia celular respectivamente, contra la línea MG063.

Palabras clave: Biotecnología, cianobacterias, metabolitos primarios, depuración de aguas, anticancerígenos, HCT116, MG063, promotores de crecimiento.

Abstract

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF COLOMBIAN SYNECHOCOCCALES AND OSCILLATORIALES (CYANOBACTERIA)

Cyanobacteria are among the oldest organisms on the planet; therefore, they have endured multiple environmental and biological pressures that have led to the appearance of molecules that guarantee their survival. Based on this, we sought to carry out a biotechnological characterization of the cyanobacteria from the LAUN Algae and Cyanobacteria Collection of the National University of Colombia. The strains were identified through molecular analysis, which revealed 7 possible new genera. The production of primary metabolites was analyzed, and it was found that the strain LAUN 81 (Synechoccocales Cyanobacteria) presents the highest concentration of protein (19.04% of soluble protein), the strain LAUN 34 (Pleurocapsa sp.) presents the highest concentration of carbohydrates (11.73% of soluble carbohydrates), and the strain LAUN 74 (Synechoccocales Cyanobacteria) presents the highest concentration of lipids (40.5% lipids of the total weight of biomass).

On the other hand, the strain LAUN 71 (Leptolyngbya sp.) demonstrated the best percentages of pollutant removal in synthetic wastewater, with 77.5% nitrate and 98% phosphate removal, reaching an 85.40% reduction in COD (Chemical Oxygen Demand) and 94.5% reduction of the BOD5 (Biochemical Oxygen Demand).

Finally, HPLC fractionation of methanolic extracts of the representative genera of the LAUN strains was carried out. The fractions were then tested against colorectal cancer cells (HCT116) and osteosarcoma cells (MG063). Fraction "D" of LAUN33 (Baaleninema sp.) and fraction "A" of LAUN 74 showed the highest toxicity with cell survival yields of 33.18% and 34.32%, respectively, against the HCT116 line. On the other hand, fractions E and F of strain LAUN33, fraction H of LAUN 55 (Synechoccocales Cyanobacteria), and fraction F of LAUN 74 presented

the highest toxicity with cell survival yields of 39.28%, 38.94%, 38.28%, and 38.42%, respectively, against the MG063 line.

Keywords: Biotechnology, cyanobacteria, wastewater treatment, anticancer, HCT116, MG063, growth promoters.

Contenido

1. Capítulo 1: Aplicación biotecnológica de las cianobacterias 3
1.1 Conclusiones..... 10
1.2 Bibliografías 11

2. Capítulo 2: Evaluación molecular y filogenética de Cianobacterias de la colección LAUN.....22
2.1 Introducción..... 22
2.2 Materiales y Métodos 23
2.2.1 Obtención de la biomasa 23
2.2.2 Registro fotográfico.....23
2.2.3 Desecación por Liofilización.....23
2.2.4 Extracción de ADN 23
2.2.5 Identificación molecular 24
2.3 Resultados 26
2.4 Discusión 37
2.5 Conclusiones..... 42
2.6 Bibliografía 43

3. Capítulo 3: Evaluación Bioquímica de Cianobacterias de la colección LAUN...47
3.1 Introducción..... 47
3.2 Materiales y métodos 49
3.2.1 Obtención de la biomasa de cianobacterias LAUN 49
3.2.2 Secado por Liofilización.....49
3.2.3 Cuantificación de proteínas 50
3.2.4 Cuantificación de carbohidratos.....51
3.2.5 Cuantificación de lípidos.....52
3.2.6 Cuantificación de pigmentos.....53
3.2.7 Análisis Estadístico.....53
3.3 Resultados 54
3.4 Discusión 60
3.5 Conclusiones..... 65
3.6 Bibliografía 67

4. Capítulo 4: Capacidad de remoción de contaminantes en aguas residuales sintéticas por parte de Cianobacterias de la colección LAUN.....73
4.1 Introducción..... 73
4.2 Materiales y Métodos 75
4.2.1 OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS 75
4.2.2 SÍNTESIS DE SUSTRATOS DE CRECIMIENTO 76
4.2.3 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES 77
4.2.4 MEDICIÓN DE PARÁMETROS 77

4.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 77
4.3 Resultados 78
4.3.1 Nitratos 78
4.3.2 Fosfatos 79
4.3.3 DQO 80
4.3.4 DBO_5 82
4.4 Discusión 83
4.5 CONCLUSIONES 87
4.6 BIBLIOGRAFÍAS 89

5. Capítulo 5: Actividad antimicrobiana y anticancerígena de cianobacterias colombianas 95
5.1 Introducción 95
5.2 Materiales y Métodos 96
5.2.1 Selección de Cepas de Cianobacterias 96
5.2.2 Selección de cepas Bacterianas 97
5.2.3 Obtención de extractos y fracciones 97
5.2.4 Bioensayos 98
5.3 Resultados 101
5.3.1 Obtención de los fraccionamientos 101
5.3.2 antimicrobianos 105
5.3.3 Actividad anticancerígena 106
5.4 Discusión 109
5.5 Conclusiones 115
5.6 Bibliografía 116

6. Conclusiones 120

7. Recomendaciones 123

8. Agradecimientos 125

Lista de figuras

Figura 1-1: Esquema general en la biosíntesis de policétidos (PKs). Se ilustran los múltiples dominios implicados en la síntesis de PKs tales como los dominios policetido sintetasa (PKS), cetosintasa (KS), dominios acil-transferasa (AT), dominios de proteínas acarreadoras de acilos (ACP), dominios tioesterasa (TE), dominios cetoreductasa (KR), dominios dehidratasa (DH), dominios enoil-reductasa (ER) y dominios metil-transferasa (MT) Tomado de (del Cerro-Sánchez *et al.*, 2017) 6
Figura 1-2: Esquema general en la biosíntesis de péptidos no ribosomales (NRPs) se ilustran los módulos de la proteínas acarreadoras de péptidos (PCP), dominios de condensación (C) y dominios de adenilación (A), Tomado de (del Cerro-Sánchez *et al.*, 2017)..... 7
Figura 2-1: Micrografías ópticas a 1000X de las cianobacterias LAUN 31 (a), LAUN 32 (b), LAUN 33 (c), LAUN 37 (d), LAUN 38 (e), LAUN 41 (f), LAUN 42 (g), LAUN 43 (h), LAUN 44 (i), LAUN 45 (j), LAUN 46 (k), LAUN 47 (l), pertenecientes al orden Oscillatorialles. (género *Baaleninema*) 28
Figura 2-2: Micrografías ópticas a 1000X de las cianobacterias LAUN 34 (a), LAUN 78 (b), LAUN 79 (c), LAUN 82 (d), pertenecientes a cepas del orden Pleurocapsales. 29
Figura 2-3: Micrografías ópticas a 1000X de las cianobacterias LAUN 29 (a), LAUN 35 (b), LAUN 48 (c), LAUN 54 (d), LAUN 55(e), LAUN 56 (f), LAUN 57 (g), LAUN 58 (h), LAUN 59 (i), LAUN 60 (j), LAUN 61 (k), LAUN 63 (l), LAUN 69 (m), LAUN 70 (n), LAUN 71 (o), LAUN 72 (p), LAUN 73 (q), LAUN 74 (r), LAUN 75 (s), LAUN 76 (t), LAUN 77 (u), LAUN 80 (v), LAUN 81 (w), pertenecientes al orden Synechococcales. 32
Figura 2-4: Árbol Filogenético de las cepas LAUN 36
Figura 2-5: Composición morfológica y filogenética de cianobacterias del cepario LAUN 37
Figura 3-1: Calibración de los tiempos de extracción de proteína con buffer PO_4..... 50
Figura 3-2: Acumulación de proteínas solubles de las cepas LAUN. *(p=0.01), **(p=0.001)..... 55
Figura 3-3. Acumulación de ficobiliproteínas totales de las cepas LAUN..... 56
Figura 3-4 Concentración de ficobiliproteínas de las cepas LAUN. *(p=0.01), **(p=0.001) 57
Figura 3-5. Acumulación de carbohidratos solubles de las cepas LAUN **(p=0.001).... 58
Figura 3-6. Lípidos totales de las cepas LAUN. *(p=0.01), **(p=0.001)..... 59
Figura 4-1: Remoción del ion nitrato por parte de las cepas de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01 79

Figura 4-2: Remoción del ion fosfato por parte de las cepas de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01 80
Figura 4-3: Reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) por parte de las de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01 82
Figura 4-4: Reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO_5) por parte de las cepas de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01 83
Figura 5-1: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 29 101
Figura 5-2: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 33 102
Figura 5-3: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 34 102
Figura 5-4: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 45 102
Figura 5-5: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 47 103
Figura 5-6: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 55 103
Figura 5-7: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 69 103
Figura 5-8: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 74 104
Figura 5-9: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 75 104
Figura 5-10: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 78 104
Figura 5-11: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 79 105
Figura 5-12: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 81 105
Figura 5-13: Prueba de Toxicidad en línea celular HCT-116. los extractos resaltados en rojo (LAUN 33D y LAUN 74A) indican las fracciones con mayor toxicidad en la línea del cáncer 106
Figura 5-14: Prueba de toxicidad en línea celular MG-63, los extractos resaltados en rojo (LAUN 33E, F; LAUN 55H y LAUN 74F) indican las fracciones con mayor toxicidad en la línea cancerosa 107
Figura 5-15: Prueba de toxicidad de la línea celular 3T3L1. Los extractos resaltados en rojo (LAUN 34C y LAUN 74D) indican las fracciones que demuestran estimulación del crecimiento en la línea celular. 108
Figura 5-16: Prueba de toxicidad en línea celular HCMEC. El extracto resaltado en rojo (LAUN 34B) indica la fracción que demuestra estimulación del crecimiento en la línea celular. 109

Lista de tablas

Tabla 2-1: Programa de PCR para la amplificación del gen 16S de Cianobacterias 24
Tabla 2-2: Clasificación molecular de las cepas LAUN 33
Tabla 3-1: Curva de calibración de proteínas solubles..... 51
Tabla 3-2: Curva de calibración de carbohidratos solubles 52
Tabla 4-1: Cepas LAUN utilizadas para el tratamiento de aguas residuales sintéticas... 75
Tabla 4-2: Composición del agua residual sintética (Medio Basal Agua Residual Sintética) 76
Tabla 6-1: Listado de cepas y potenciales usos según sus capacidades productivas...121

Introducción

Las cadenas de valor están evolucionando hacia procesos renovables y sus impactos ya se están viendo en varios sectores. A nivel empresarial, Colombia cuenta con 157 compañías biotecnológicas con aplicaciones en los sectores de cosméticos, medicina, industria, agropecuario, alimentos, ambiente y energía (Minciencias, 2016).

Las cianobacterias, a lo largo de su historia natural han sido sometidas a diversas presiones de selección a medida que colonizaban distintos ambientes, desarrollando así diversas estrategias, la mayoría basadas en el surgimiento y constante edición de metabolitos secundarios con potentes propiedades bioactivas. De estos productos podemos enumerar los más notables en aplicaciones industriales, tales como pigmentos, toxinas, carbohidratos, antifúngicos, antivirales, entre otros, siendo destacables los pigmentos y compuestos farmacéuticos, que ya por tradición son de utilidad tecnológica e industrial (Puglisi *et al.*, 2019; Pagels *et al.*, 2019).

Estudios exploratorios realizados por la Universidad Nacional de Colombia con cianobacterias han reportado que la biodiversidad colombiana de estos microrganismos presenta un alto potencial en metabolitos secundarios con actividad citotóxica, generando expectativas en la incursión hacia la búsqueda de nuevos compuestos de utilidad farmacológica (Cano, 2018; Peña, 2019 y Forero, 2020).

Por lo tanto, en el presente proyecto se busca caracterizar el potencial biotecnológico de las cepas nativas de Synechococcales y Oscillatoriales de la colección del Laboratorio del Cultivo de Algas de la Universidad Nacional de Colombia (LAUN), evaluando el contenido de macromoléculas, su capacidad de

remoción de materia orgánica , la presencia de genes característicos de metabolitos secundarios de las familias policétidos y péptidos no ribosomales y la capacidad anticancerígena de estos en cultivos celulares humanos.

1. Capítulo 1: Aplicación biotecnológica de las cianobacterias

Las cianobacterias son organismos procariotas del dominio Bacteria, aparecieron en la tierra hace aproximadamente 3,5 miles de millones de años (Cavalier-Smith, 1998). Denominadas originalmente "algas verdeazules" debido a la semejanza con las algas simples, actualmente su reconocimiento y declaración de origen es bacteriano filogenético y las células de estructura procariota (bacteriana) (Komárek, 2019) y con capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica (Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011). La proliferación de estos organismos multiplicó las presiones de selección ejercidas desde los nuevos nichos ocupados, formando en las cianobacterias diferentes estrategias para sobrepasar estos obstáculos, gran parte de dichas estrategias y diversidad metabólica se basan en el desarrollo mecanismos eficientes de obtención de nutrientes y la producción de metabolitos secundarios (MS) con potente bioactividad que, entre otras cosas, resaltan sus propiedades citotóxicas.

A lo largo de su historia natural han generado numerosos compuestos como MS, toxinas, ficobiliproteínas, carbohidratos extracelulares, proteínas de alta digestividad, lípidos, compuestos inhibitorios de quórum sensing, antifúngicos, antivirales entre otros (González-Balderas *et al.*, 2020; J. Kumar *et al.*, 2018; Mondal *et al.*, 2020; Pagels *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2018); se destacan aquellos que por tradición son de utilidad tecnológica o industrial, ya sea como pigmentos para tinciones simples en distintos procesos productivos, hasta compuestos farmacéuticos para el tratamiento de afecciones consideradas “incurables” (Abed *et al.*, 2009; Pagels *et al.*, 2019; Puglisi *et al.*, 2019; Thajuddin & Subramanian, 2005).

De dichas aplicaciones industriales, es extendido el uso de diferentes tintes naturales tales como las ficobiliproteínas, estos son pigmentos fotosintéticos accesorios que se agregan en la célula en estructuras denominadas ficobilisomas,

anclados a la membrana del tilacoide (İlter *et al.*, 2018). Las ficobiliproteínas de las cianobacterias se pueden dividir en tres clases: ficoeritrina (PE) de color rosa brillante o rojo, ficocianina (PC) de color azul oscuro y aloficocianina (APC) de color azul claro. Estos pigmentos son ampliamente usados en fármacos, alimentos, cosméticos y materiales fluorescentes. La PC se caracteriza por ser un pigmento soluble en agua, que, además de ser empleado en diversas áreas de la industria, tiene importantes propiedades como antioxidante, anti-inflamatorio y hepatoprotector (İlter *et al.*, 2018). Esta molécula tiene una subunidad tetrapirrólica, la ficocianobilina, que corresponde al cromóforo que confiere el color azul intenso a la PC, la cual, está generalmente en grupos de tres por cada monómero de la proteína (Goyena & Fallis, 2019). En estudios y revisiones se exponen los rendimientos de proteínas, carbohidratos y lípidos por parte de distintos géneros y especies de cianobacterias resaltando a *Arthrospira platensis, A. máxima* y *Synechococcus sp*. dada su capacidad productiva de proteínas de 81%, 71% y 63% respectivamente y en general digestibilidad de las mismas sobre el 90% (Grossmann *et al.*, 2020), lípidos transesterificables de cadena media y larga con rendimientos de 9%, 7% y 11% respectivamente y carbohidratos totales con acumulación de 14%, 16% y 15%, del peso seco de la biomasa respectivamente (Carrasco-Reinado *et al.*, 2019; Grossmann *et al.*, 2020; Hachicha *et al.*, 2022; Kanaga *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2016).

Los MS pueden clasificarse según la estructura química del metabolito base, teniendo de esta forma terpenos, alcaloides, péptidos ribosomales y no ribosomales (NRPs), policétidos (PKs) y polisacáridos (del Cerro-Sánchez *et al.*, 2017; Mondal *et al.*, 2020). Los compuestos más comunes que demuestran actividades del tipo farmacéutico, en su mayoría son del tipo: alcaloides (estaurosporina, ambigoles, amicolactam, marinoquinolina A), PKs (chromona, engiodontiumonas H, pestalpoliol I, hitidchromona A, B, C, y E), terpenos (meroterpenos, diterpeno, y escopararano I), peptidos (beauvericina, polimixina B y otros NRPs), nucleósidos (citarabina, gemcitabina y otros análogos de nucleósidos) y carbohidratos (laminaran, ácido algínico, y otros polisacáridos sulfatados) (Jones *et al.*, 2020; Mondal *et al.*, 2020).

Entre los MS con actividad antiviral se encuentran: Spirulan que es un polisacárido sulfatado proveniente de *A. platensis* (El-Sheekh *et al.*, 2022), Nostoflan que corresponde a un polisacárido aislado de *Nostoc flageliforme* (Nowruzi *et al.*, 2020), Cyanovirin N una lectina aislada de *N. ellipsosporum* (Lotfi *et al.*, 2018), y Scytovirin N correspondiente a una lecitina aislada de *Scytonema varium* (Lotfi *et al.*, 2018). También se han aislado diversos tipos de agentes anticancerígenos y antitumorales como: Cryptophycin con estructura de depsipeptido cíclico de acción antimitótica aislado de *Nostoc sp.* (Figueras *et al.*, 2018), Dolastatina la cual es un péptido con acción antimitótica, éste en un comienzo fue descubierto y aislado del molusco *Dolabella auricularia* y posteriormente atribuida su presencia y acumulación a la dieta del molusco que se basa en cianobacterias del género *Symploca sp.* (Rodríguez León, 2020), Apratoxina A que es una proteína con acción citotóxica anticancerígena aislada de *L. majuscula* (Kultschar *et al.*, 2019), Bisebromoamida que corresponde a un péptido heterocíclico con acción anticancerígena aislado de *Lyngbya sp.* (Suenaga & Iwasaki, 2020). También se han descrito compuestos con actividades antiinflamatorias como las Malingamidas A, B, C, F y G que corresponden a una estructura glicoprotéica aisladas de la cianobacteria *L. majuscula* (Li *et al.*, 2021), o las Pompanopeptinas las cuales son péptidos aislados de diversas cianobacterias marinas y poseen efectos antiinflamatorios, reguladores de glicemia y antitumorales (Manogar *et al.*, 2019).

Los MS derivados de PKs y NRPs, representan la mayoría de las estructuras detectadas con actividades farmacológicas interesantes. Los PKs son estructuras que constituyen el grupo de MS más diverso hasta el momento, sintetizados por policétido sintetasas (PKS) (Figura 1-1) (Fujii *et al.*, 2001; Olishevska *et al.*, 2019). La producción de los PKs mediada por la acción enzimática de PKS, genera la polimerización de la cadena mediante reacciones consecutivas de tipo síntesis Claisen (Forero Cujiño, 2019; Fujii *et al.*, 2001; Peña, 2019).

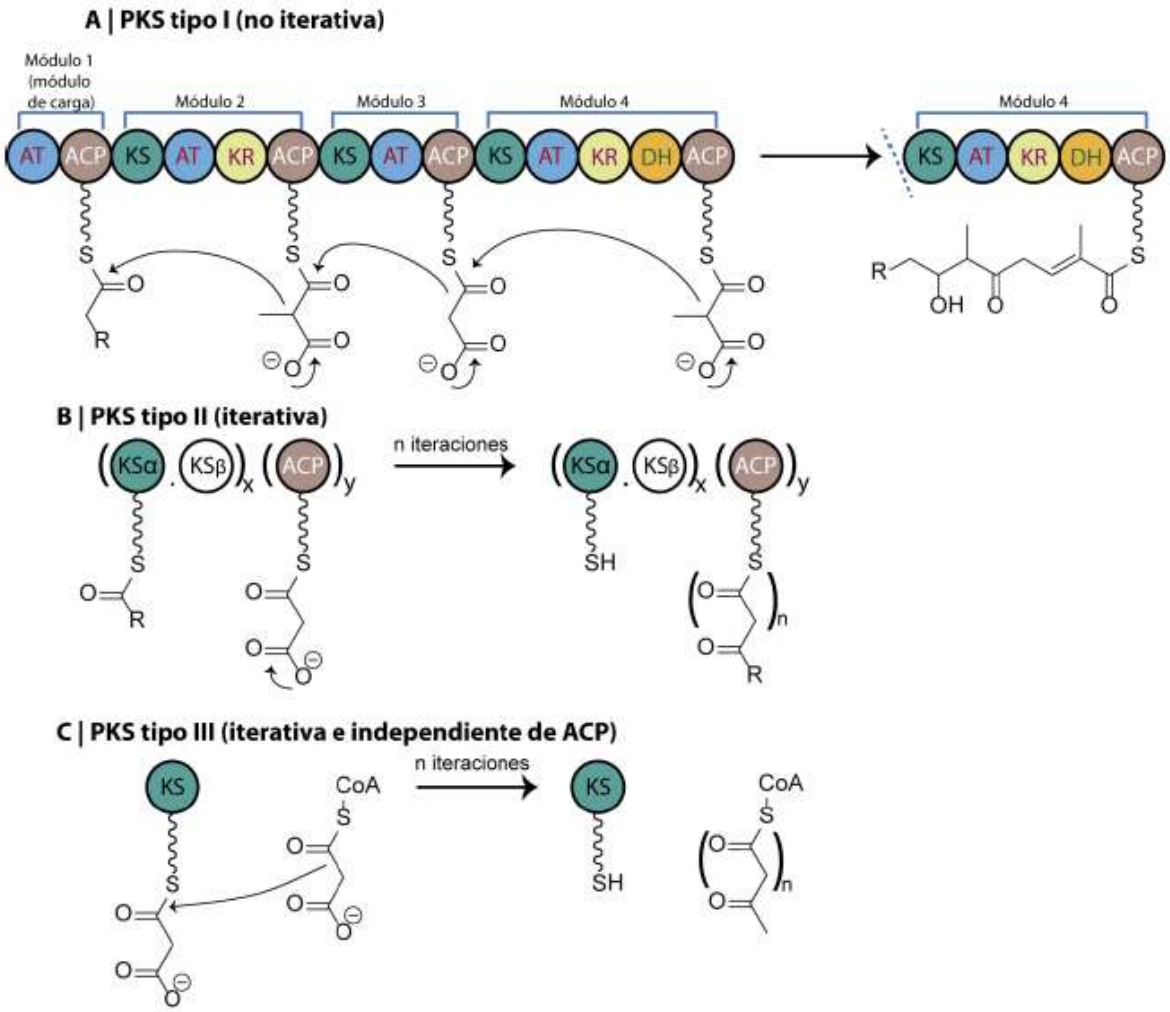


Figura 1-1: Esquema general en la biosíntesis de policétidos (PKs). Se ilustran los múltiples dominios implicados en la síntesis de PKs tales como los dominios policetido sintetasa (PKS), cetosintasa (KS), dominios acil-transferasa (AT), dominios de proteínas acarreadoras de acilos (ACP), dominios tioesterasa (TE), dominios cetoreductasa (KR), dominios dehidratasa (DH), dominios enoil-reductasa (ER) y dominios metil-transferasa (MT) Tomado de (del Cerro-Sánchez *et al.*, 2017)

Por otro lado, los NRPs, que se sintetizan fuera de la acción ribosomal, pueden tener diversas funciones, entre las cuales se observan efectos antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios y citotóxicos (Nagarajan *et al.*, 2012; Shishido *et al.*, 2019; Walsh, 2008). Los NRPs son sintetizados por sintasas de NRPs, que son enzimas con múltiples módulos (Figura 1-2), y al igual que las PKs, cada módulo tiene una tarea única en la construcción del NRPs, adicionando módulos específicos a la cadena peptídica en síntesis (Finking & Marahiel, 2004; Kurmayer *et al.*, 2020).

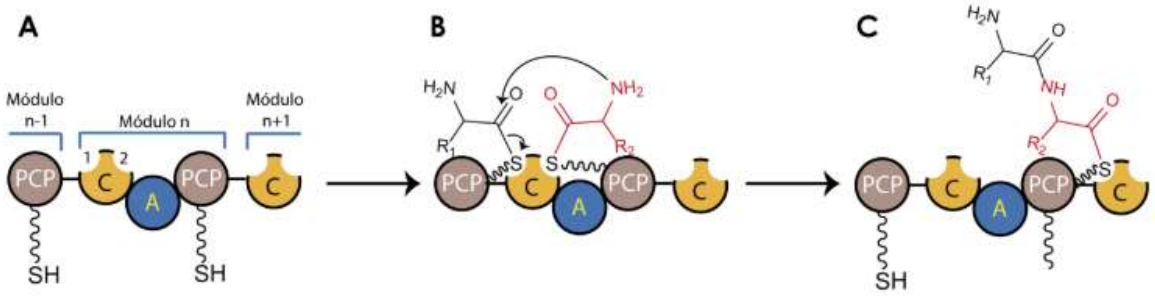


Figura 1-2: Esquema general en la biosíntesis de péptidos no ribosomales (NRPs) se ilustran los módulos de la proteínas acarreadoras de péptidos (PCP), dominios de condensación (C) y dominios de adenilación (A), Tomado de (del Cerro-Sánchez *et al.*, 2017)

Dentro de las proteínas de la familia de las politeonamidas sobresalen las proteusinas que han demostrado la capacidad de generar poros estables en la membrana celular (Bösch *et al.*, 2020) o péptidos del tipo depsipéptidos que ya se ha probado que tienen efectos favorables en casos de infarto (Musale *et al.*, 2020).

Los estudios exploratorios realizados por el Laboratorio de Cultivo de Algas de la Universidad Nacional con cianobacterias (Cano, 2018; Forero Cujiño, 2019; Peña, 2019) han mostrado que las especies colombianas presentan un alto potencial en MS, teniendo una colección de más de 20 cepas de cianobacterias que ya han dado resultados positivos preliminares para actividad antifúngica, antibacteriana y anticancerígena, lo que permite avanzar en la investigación con seguridad en la búsqueda de las moléculas asociadas a estas actividades citotóxicas, con potencial de generar patentes y empresa a partir de las mismas. Por otra parte, las investigaciones del Laboratorio Cultivo de Algas consiguieron superar la dificultad de mantener estas especies en cultivo in vitro, alcanzando la producción de biomasa suficiente para las metodologías de extracción y análisis de metabolitos secundarios y pigmentos (Cano, 2018).

Otro campo para el aprovechamiento de estos organismos es el ambiental, el tratamiento de aguas residuales mediante el uso de cianobacterias aprovechando las capacidades metabólicas de estos organismos para la captación de nutrientes en aguas eutróficas, representa una salida práctica y de bajo costo en

comparación con los valores de sostenimiento anual de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) (Millán, 2014). Este mecanismo es amigable con el medio ambiente, produce altos rendimientos en remoción de materia orgánica, es fácilmente reproducible, oxigena el agua, remueve nitrógeno (A. Kumar & Bera, 2020; Miranda, 2018; Salbitani & Carfagna, 2021), fósforo (Larsdotter, 2006; Lavrinovics *et al.*, 2021; Su, 2020), y genera productos secundarios con alto valor comercial (Hamida *et al.*, 2020; Parida *et al.*, 2022; Robles-Bañuelos *et al.*, 2022), adicionalmente, este tipo de tecnologías facilitan el biosecuestro, quelación y recuperación de metales pesados por parte de la biomasa generada en el sistema (Ahmad, 2022; Rengifo *et al.*, 2012), en el mismo sentido, esta biomasa posee capacidad inherente para la producción de lípidos y carbohidratos que pueden derivar en la generación de biocombustibles, aceites o fermentación de carbohidratos (Adesalu & Kuti, 2020; Carrasco-Reinado *et al.*, 2019) o producir MS con valor agregado (Cai *et al.*, 2013; Hachicha *et al.*, 2022).

En términos bioindustriales, la aplicabilidad en cuanto a metabolismo primario y secundario de las cianobacterias es virtualmente ilimitada ya que tienen la capacidad de producción de un amplio abanico de alcaloides, depsipéptidos, lipopéptidos, macrólidos, péptidos, terpenos, polisacáridos con potenciales aplicaciones industriales (Bösch *et al.*, 2020; Demay *et al.*, 2019; Gkelis *et al.*, 2019; Konstantinou *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2008; Papadopoulos *et al.*, 2020). Numerosos países industrializados han destinado millones en recursos para el desarrollo de investigación en bioprospección, estudio de múltiples especies de cianobacterias y sus MS, inclusive, el único medicamento contra cáncer de mama a base de un MS aprobado por los Estados Unidos (FDA) proviene de una cianobacteria (Finking & Marahiel, 2004). En términos económicos, la comercialización de algas podría alcanzar un valor mundial en 2030 de 2.1 billones de dólares, con una tasa de crecimiento anual promedio de 4.8% en los próximos 8 años, según el análisis de mercado elaborado por plataformas dedicadas a este rubro (Allied Market Research, 2018; Market Research, 2022). En un informe de Allied Market Research (2018), titulado “Mercado de productos de algas-Análisis de oportunidades globales y pronóstico de la industria (2018-

2022)”, se menciona que el mercado mundial de productos derivados de algas alcanzaría USD $ 3,318.1 Millones para 2022, creciendo este, a un ritmo anual promedio de 6.7% durante el período (Bioeconomia 2018). En otro informe publicado por Allied Market Research (2018), titulado "Mercado de productos de algas por tipo, fuente, forma y aplicación: Análisis de oportunidades globales y pronóstico de la industria, 2018 - 2025", pronostica que el mercado global de productos de algas generará $ 3,451 millones para 2025, creciendo a una tasa compuesta anual del 4,2% entre 2018 y 2025. En 2017, el segmento de alimentos y bebidas lideró el mercado de productos de algas, seguido del cuidado personal. El crecimiento en este segmento se complementa con el aumento de la población mundial, el aumento de la conciencia sobre los productos alimenticios saludables y el notable sobrecosto de proteínas de fuentes tradicionales, un nutriente principal en el producto alimenticio (Allied Market Research, 2020). A nivel mundial el mercado de Spirulina reportó ventas por 348 millones de dólares al 2018 y se estiman ventas por 779 millones de dólares al año 2026 con un índice de crecimiento del 10,5% entre el 2019 y el 2026 según la plataforma Allied Market Research (https://www.alliedmarketresearch.com/spirulina-market), convirtiendo a las cianobacterias, además de una promesa biotecnológica como respuesta a múltiples necesidades contemporáneas en el desarrollo humano, en una excelente oportunidad de negocio en el mercado colombiano por su casi inexistente cobertura actual.

Colombia, en términos empresariales, actualmente dispone de dos empresas cultivadoras de Spirulina con productos registrados ante el INVIMA, y una empresa que importa casi la totalidad de su materia prima de Ecuador, ellos se encargan de innovar principalmente en el campo nutraceútico, dando valor agregado a sus productos de donde obtienen su rentabilidad.

Finalmente, con el fin de explorar y describir el potencial de dicha biodiversidad, se deben generar sistemas de clasificación y almacenamiento de estos organismos, propiciando la conformación de ceparios, que, como definición

clásica y canónica: son colecciones de microorganismos vivos (en este caso, microalgas), cuyo principal objetivo es mantener dichas cepas disponibles, propagándolas por clonación para producir copias idénticas. Las cepas generalmente son de utilidad en diversos campos y fines: ya sea en investigación científica (biología, fisiología, taxonomía), educación, industria (escalamiento y producción de biomasa con múltiples propósitos) y biotecnología (aislamiento y masificación de biocompuestos con aplicaciones industriales) (Virgen, 2016). La ambigüedad asociada al re-aislamiento subraya la necesidad de hacer depósitos de microorganismos en una colección de cultivos que proporcione servicio de conservación experimentada, rápido acceso y la provisión de una cepa de referencia única y conservada (Arencibia *et al.*, 2014).

1.1 Conclusiones

Es posible dilucidar a las cianobacterias como organismos que cumplen un papel ecológico fundamental en la producción primaria de nutrientes y oxígeno, el control biológico de organismos, la sorción y mineralización de compuestos en los distintos ciclos biogeológicos, y como una prometedora alternativa eficiente para la producción de moléculas bioactivas con múltiples aplicaciones en el campo farmacéutico, como fuentes de pigmentos, películas solares y antioxidantes, incluso como una fuente nueva y renovable de productos alimenticios, lo que puede favorecer el desarrollo de economías emergentes como la colombiana en medio de las actuales coyunturas energéticas y medioambientales por las que atraviesa el planeta entero.

1.2 Bibliografías

Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(1), 1–12. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x

Adesalu, T., & Kuti, F. (2020). Phytochemicals , total lipids and molecular characterization of West African strain of Oscillatoria sp . (Cyanobacterium) isolated from Ceratophyllum demersum L . (Hornwort). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *9*(3), 18–25.

Ahmad, I. Z. (2022). The usage of Cyanobacteria in wastewater treatment: prospects and limitations. *Letters in Applied Microbiology*, *75*(4), 718–730. https://doi.org/10.1111/lam.13587

Allied Market Research. (Mayo de 2018). Global seaweed market opportunities and forecast 2018-2024. https://www.alliedmarketresearch.com/seaweed-market

Allied Market Research. (Mayo de 2018). Seaweed Market by Product and Application - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2018-2024. https://www.researchandmarkets.com/reports/4580612/seaweed-market-by-product-and-application

Arencibia, D. F., Fernández Rosario, A., & Gámez Menéndez, R. (2014). *Métodos generales de conservación de microorganismos*. *January 2008*.

Ayala, F. (2017). *Búsqueda de compuestos con posible actividad a partir de cianobacterias marinas del Caribe colombiano. Tesis de Maestría*.

Bayona Maldonado, L. M. (2014). *Estudio químico y evaluación de la actividad citotóxica de metabolitos secundarios provenientes de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano*. http://www.bdigital.unal.edu.co/20433/

Becerra, L. (2017). *Evaluación del perfil metabólico de un consorcio de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano bajo condiciones de cultivo. (Tesis de Maestría).* https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/62324

Bioeconomía (Enero 17 de 2018). Pronostican un mercado mundial de algas de USD 3,318 millones para 2022., https://www.bioeconomia.info/2018/01/17/pronostican_mercado_mundial_de_algas_de_usd_3318_millones_para_2022/

Blunt, J., Copp, B., Keyzers, R., Munro, M., & Prinsep, M. (2009). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *26*(2), 170–244. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.004

Bösch, N., Mariana, B., Greczmiel, U., Morinaka, B., Gugger, M., Oxenius, A., Vagstad, A. L., & Piel, J. (2020). Landornamides, antiviral ornithine-containing ribosomal peptides discovered by proteusin mining. *Angewandte Chemie*. https://doi.org/10.1002/ange.201916321

Bravakos, P., Kotoulas, G., Skaraki, K., Pantazidou, A., & Economou-Amilli, A. (2016). A polyphasic taxonomic approach in isolated strains of Cyanobacteria from thermal springs of Greece. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *98*, 147–160. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.009

Brito, Â., Gaifem, J., Ramos, V., Glukhov, E., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., Vasconcelos, V. M., Mendes, M. V., & Tamagnini, P. (2015). Bioprospecting Portuguese Atlantic coast cyanobacteria for bioactive secondary metabolites reveals untapped chemodiversity. *Algal Research*, *9*, 218–226. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.016

Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *19*, 360–369. https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030

Cano, J. (2018). Conservación in vitro y cultivo de Cyanoprocariotas bentónicas

arrecifales de Providencia y Santa Catalina Islas, Colombia. Tesis de Maestría. In *Universidad Nacional de Colombia*.

Carrasco-Reinado, R., Escobar, A., Carrera, C., Guarnizo, P., Vallejo, R. A., & Fernández-Acero, F. J. (2019). Valorization of microalgae biomass as a potential source of high-value sugars and polyalcohols. *Lwt - Food Science and Technology*, *114*(January 2019), 108385. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108385

Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *73*(3), 203–266. https://doi.org/10.1017/s0006323198005167

De Vero, L., Boniotti, M. B., Budroni, M., Buzzini, P., Cassanelli, S., Comunian, R., Gullo, M., Logrieco, A. F., Mannazzu, I., Musumeci, R., Perugini, I., Perrone, G., Pulvirenti, A., Romano, P., Turchetti, B., & Varese, G. C. (2019). Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: The perspective of the italian network of culture collections. *Microorganisms*, *7*(12). https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685

del Cerro-Sánchez, C., García-López, J. L., & Galán-Dicilia, B. (2017). *Desarrollo de herramientas moleculares para la producción de policétidos y péptidos no ribosomales*.

Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A., & Marie, B. (2019). Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. In *Marine Drugs* (Vol. 17, Issue 6). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/md17060320

El-Sheekh, M., El-Dalatony, M. M., Thakur, N., Zheng, Y., & Salama, E. S. (2022). Role of microalgae and cyanobacteria in wastewater treatment: genetic engineering and omics approaches. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *19*(3), 2173–2194. https://doi.org/10.1007/s13762-021-03270-w

Figueras, E., Borbély, A., Ismail, M., Frese, M., & Sewald, N. (2018). Novel unit B

cryptophycin analogues as payloads for targeted therapy. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *14*, 1281–1286. https://doi.org/10.3762/bjoc.14.109

Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology*, *58*, 453–488. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123615

Forero Cujiño, M. A. (2019). *Determinación de Cyanoprokaryotas planctónicas y su potencial en la producción de cianotoxinas en un embalse de la sabana de Bogotá - Colombia*.

Fujii, I., Watanabe, A., Sankawa, U., & Ebizuka, Y. (2001). Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of Aspergillus nidulans. *Chemistry and Biology*, *8*(2), 189–197. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)90068-1

Gkelis, S., Panou, M., Konstantinou, D., Apostolidis, P., Kasampali, A., Papadimitriou, S., Kati, D., Di Lorenzo, G. M., Ioakeim, S., Zervou, S. K., Christophoridis, C., Triantis, T. M., Kaloudis, T., Hiskia, A., & Arsenakis, M. (2019). Diversity, cyanotoxin production, and bioactivities of cyanobacteria isolated from freshwaters of greece. *Toxins*, *11*(8). https://doi.org/10.3390/toxins11080436

González-Balderas, R. M., Velásquez-Orta, S. B., Valdez-Vazquez, I., & Orta Ledesma, M. T. (2020). Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae Desmodesmus sp. by using ultrasound or ozone. *Ultrasonics Sonochemistry*, *62*, 104852. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104852

Goyena, R., & Fallis, A. . (2019). The Molecular Biology of Cyanobacteria. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2020). Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein-based

technofunctional food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(17), 2961–2989. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1672137

Hachicha, R., Elleuch, F., Hlima, H. Ben, Dubessay, P., de Baynast, H., Delattre, C., Pierre, G., Hachicha, R., Abdelkafi, S., Michaud, P., & Fendri, I. (2022). Biomolecules from Microalgae and Cyanobacteria: Applications and Market Survey. *Applied Sciences (Switzerland)*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/app12041924

Hamida, R. S., Abdelmeguid, N. E., Ali, M. A., Bin-Meferij, M. M., & Khalil, M. I. (2020). Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Novel Cyanobacteria Desertifilum sp. extract: Their Antibacterial and Cytotoxicity Effects . *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 49–63. https://doi.org/10.2147/ijn.s238575

Hitchcock, A., Hunter, C. N., & Canniffe, D. P. (2020). Progress and challenges in engineering cyanobacteria as chassis for light-driven biotechnology. *Microbial Biotechnology*, *13*(2), 363–367. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13526

Hohmann-Marriott, M. F., & Blankenship, R. E. (2011). Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 515–548. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103811

İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, *70*(April), 78–88. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007

Jaramillo-martínez, S., & González, M. E. (2018). *Obtención de un biopolímero a base de exopolisacáridos extraídos de cultivos de Chlorella vulgaris*. 1–3. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007.2

Jones, M. R., Pinto, E., Torres, M. A., Dörr, F., Mazur-Marzec, H., Szubert, K., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Miles, C. O., Beach, D. G., McCarron, P., Sivonen, K., Fewer, D. P., Jokela, J., & Janssen, E. M. L. (2020).

Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria. *BioRxiv*, *C*, 1–16. https://doi.org/10.1101/2020.04.16.038703

Kamravamanesh, D., Kiesenhofer, D., Fluch, S., Lackner, M., & Herwig, C. (2019). Scale-up challenges and requirement of technology-transfer for cyanobacterial poly (3-hydroxybutyrate) production in industrial scale. *International Journal of Biobased Plastics*, *1*(1), 60–71. https://doi.org/10.1080/24759651.2019.1688604

Kanaga, S., Silambarasan, T., Malini, E., Mangayarkarasi, S., & Dhandapani, R. (2022). Optimization of biomass production from Chlorella vulgaris by response surface methodology and study of the fatty acid profile for biodiesel production: A green approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *45*(October), 102505. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102505

Komárek, J. (2019). Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria (2019). *Fottea*, *20*(1), 104–110. https://doi.org/10.5507/fot.2019.020

Konstantinou, D., Mavrogonatou, E., Zervou, S. K., Giannogonas, P., & Gkelis, S. (2020). Bioprospecting Sponge-Associated Marine Cyanobacteria to Produce Bioactive Compounds. *Toxins*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/toxins12020073

Kultschar, B., Dudley, E., Wilson, S., & Llewellyn, C. A. (2019). Intracellular and extracellular metabolites from the cyanobacterium chlorogloeopsis fritschii, pcc 6912, during 48 hours of uv-b exposure. *Metabolites*, *9*(74). https://doi.org/10.3390/metabo9040074

Kumar, A., & Bera, S. (2020). Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation. *Bioresource Technology Reports*, *12*(October), 100584. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100584

Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M. B., & Kumar, A. (2018). Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications* (Vol. 7421). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7

Kurmayer, R., Entfellner, E., Weisse, T., Offterdinger, M., Rentmeister, A., & Deng, L. (2020). Chemically labeled toxins or bioactive peptides show a heterogeneous intracellular distribution and low spatial overlap with autofluorescence in bloom-forming cyanobacteria. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59381-w

Larsdotter, K. (2006). *Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate* (p. 36).

Lavrinovics, A., Murby, F., Ziverte, E., Mezule, L., & Juhna, T. (2021). Increasing Phosphorus Uptake Efficiency by Phosphorus-Starved Microalgae for Municipal. *Microorganisms*, *9*.

Li, Z., Zhang, L., & Zhao, Z. (2021). Malyngamide F Possesses Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity in Rat Models of Inflammation. *Pain Research and Management*, *2021*. https://doi.org/10.1155/2021/4919391

Lotfi, H., Sheervalilou, R., & Zarghami, N. (2018). An update of the recombinant protein expression systems of Cyanovirin-N and challenges of preclinical development. *BioImpacts*, *8*(2), 139–151. https://doi.org/10.15171/bi.2018.16

Manogar, P., Vijayakumar, S., Rajalakshmi, S., Pugazhenthi, M., Praseetha, P. K., & Jayanthi, S. (2019). In silico studies on CNR1 receptor and effective cyanobacterial drugs: Homology modelling, molecular docking and molecular dynamic simulations. *Gene Reports*, *17*, 100505. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100505

Martins, R. F., Ramos, M. F., Herfindal, L., Sousa, J. A., Skaerven, K., & Vasconcelos, V. M. (2008). Antimicrobial and Cytotoxic Assessment of Marine Cyanobacteria - Synechocystis and Synechococcus. In *Mar. Drugs* (Vol. 6, Issue 1). www.mdpi.org/marinedrugs

Millán, G. S. M. (2014). Evaluacion economica de un sistema de tratamiento de aguas residuales en la ciudad de Guadalajara de Buga. *Facultad de Ciencias Sociales y Económicas Universisdad Del Valle*, *1*, 1–63.

https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Minciencias, 2016, Colombia BIO, Bogota, Colombia

Ministerio de Medio Ambiente. (2019, 21 mayo). Minambiente. https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/4317-colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo-celebra-el-dia-mundial-de-la-biodiversidad

Miranda, F. (2018). Purificación de agua : eliminación de nitratos , nitritos y compuestos orgánicos utilizando catalizadores en polvo y estructurados. In *Universidad Nacional Del Litoral* (Vol. 1, Issue 4). www.univeersidaddellit.com

Mondal, A., Bose, S., Banerjee, S., Patra, J. K., Malik, J., Mandal, S. K., Kilpatrick, K. L., Das, G., Kerry, R. G., Fimognari, C., & Bishayee, A. (2020). Marine cyanobacteria and microalgae metabolites—A rich source of potential anticancer drugs. *Marine Drugs*, *18*(9). https://doi.org/10.3390/md18090476

Montalvão, S., Demirel, Z., Devi, P., Lombardi, V., Hongisto, V., Perälä, M., Hattara, J., Imamoglu, E., Tilvi, S. S., Turan, G., Dalay, M. C., & Tammela, P. (2016). Large-scale bioprospecting of cyanobacteria, micro- and macroalgae from the Aegean Sea. *New Biotechnology*, *33*(3), 399–406. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.02.002

Musale, A. S., Kumar, G. R. K., Sapre, A., & Dasgupta, S. (2020). Marine Algae as a Natural Source for Antiviral Compounds. *AIJR Preprints*, *38*(1), 1–6.

Nagarajan, M., Maruthanayagam, V., & Sundararaman, M. (2012). A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. *Journal of Applied Toxicology*, *32*(3), 153–185. https://doi.org/10.1002/jat.1717

Nowruzi, B., Sarvari, G., & Blanco, S. (2020). The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal Research*, *49*(November 2019), 101959. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101959

Olishevska, S., Nickzad, A., & Déziel, E. (2019). Bacillus and Paenibacillus secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(3), 1189–1215. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9541-0

Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, *37*(3), 422–443. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010

Papadopoulos, K. P., Economou, C. N., Tekerlekopoulou, A. G., & Vayenas, D. V. (2020). Two-step treatment of brewery wastewater using electrocoagulation and cyanobacteria-based cultivation. *Journal of Environmental Management*, *265*(January), 110543. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110543

Parida, S., Sriram, M., Bhanaja, C., Sahoo, B., & Bhanja, C. (2022). *In Vitro Screening of Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activities of Cyanobacteria Found Across Odisha Coast, India SATYABRATA DASH Maharaja Sriram Chandra Bhanja Deo University*. 1–19. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1272821/v1

Pathak, J., Pandey, A., Maurya, P. K., Rajneesh, R., Sinha, R. P., & Singh, S. P. (2020). Cyanobacterial Secondary Metabolite Scytonemin: A Potential Photoprotective and Pharmaceutical Compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, *90*(3), 467–481. https://doi.org/10.1007/s40011-019-01134-5

Peña, J. (2019). *Potencial biotecnológico de Cianoprocariotas provenientes de Islas del Rosario, Colombia.*

Prato-Valderrama, J. A. (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.*

Puglisi, M. P., Sneed, J. M., Ritson-Williams, R., & Young, R. (2019). Marine

chemical ecology in benthic environments. *Natural Product Reports*, *36*(3), 410–429. https://doi.org/10.1039/c8np00061a

Rengifo, A. L., Peña, E., & Benitez, N. (2012). Efecto de la asociación alga-bacteria Bostrychia calliptera (Rhodomelaceae) en el porcentaje de remoción de cromo en laboratorio. *Biología Tropical*, *60*(September), 1055–1064.

Robles-Bañuelos, B., Durán-Riveroll, L. M., Rangel-López, E., Pérez-López, H. I., & González-Maya, L. (2022). Marine Cyanobacteria as Sources of Lead Anticancer Compounds: A Review of Families of Metabolites with Cytotoxic, Antiproliferative, and Antineoplastic Effects. *Molecules*, *27*(15). https://doi.org/10.3390/molecules27154814

Rodríguez León, C. (2020). *Search for marine natural products with cytotoxic activity.* Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Salbitani, G., & Carfagna, S. (2021). Ammonium Utilization in Microalgae : A Sustainable Method for Wastewater Treatment. *Sustainability*, *13*(2), 17. https://doi.org/10.3390/su13020956

Shishido, T. K., Popin, R. V., Jokela, J., Wahlsten, M., Fiore, M. F., Fewer, D. P., Herfindal, L., & Sivonen, K. (2019). Dereplication of natural products with antimicrobial and anticancer activity from Brazilian cyanobacteria. *Toxins*, *12*(1), 1–17. https://doi.org/10.3390/toxins12010012

Su, Y. (2020). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 144590. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590

Suenaga, K., & Iwasaki, A. (2020). Bioactive Substances from Marine Organisms. In *Topics in Heterocyclic Chemistry* (Vol. 58, p. 19). https://doi.org/10.2115/fiber.46.7_P283

Tan, L. T. (2007). Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*, *68*(7), 954–979.

https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.012

Tang, Y., Zhang, Y., Rosenberg, J. N., Sharif, N., Betenbaugh, M. J., & Wang, F. (2016). Efficient lipid extraction and quantification of fatty acids from algal biomass using accelerated solvent extraction (ASE). *RSC Advances*, *6*(35), 29127–29134. https://doi.org/10.1039/C5RA23519G

Thajuddin, N., & Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, *89*(1), 47–57.

Tiam, S. K., Gugger, M., Demay, J., Le Manach, S., Duval, C., Bernard, C., & Marie, B. (2019). Insights into the diversity of secondary metabolites of Planktothrix using a biphasic approach combining global genomics and metabolomics. *Toxins*, *11*(9). https://doi.org/10.3390/toxins11090498

Virgen, M. (2016). ¿Conservar fitoplancton vivo? Cepario de microalgas del CIBNOR. *Recursos Naturales y Sociedad*, *02*(02), 40–55. https://doi.org/10.18846/renaysoc.2016.02.02.02.0003

Walsh, C. T. (2008). The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Accounts of Chemical Research*, *41*(1), 4–10. https://doi.org/10.1021/ar7000414

Wu, X. J., Yang, H., Chen, Y. T., & Li, P. P. (2018). Biosynthesis of fluorescent β subunits of c-phycocyanin from spirulina subsalsa in escherichia coli, and their antioxidant properties. *Molecules*, *23*(6), 1–11. https://doi.org/10.3390/molecules23061369

Xue, Y., Zhao, P., Quan, C., Zhao, Z., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D., Feng, S., Bai, X., Zuo, Y., & Li, P. (2018). Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000. *Peptides*, *107*(March), 17–24. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.002

2. Capítulo 2: Evaluación molecular y filogenética de Cianobacterias de la colección LAUN

2.1 Introducción

Las cianobacterias son el grupo de procariotas fotosintéticas que se encuentran en la mayoría de los ambientes naturales o artificiales y son cuantitativamente los organismos más importantes en la tierra (Bravakos *et al.*, 2016; Criscuolo & Gribaldo, 2011; Machado Lima, 2020; Potts & Whitton, 2012). Los primeros registros datan de aproximadamente 3450 millones de años (Potts & Whitton, 2012), y se caracterizan por su amplia versatilidad metabólica. En los últimos años, se han conocido múltiples informes sobre la diversidad de cianobacterias de aguas dulces y estuarinas (De Figueiredo *et al.*, 2006; Galhano *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2012; Valério *et al.*, 2009) y sólo unos pocos estudios se han centrado en la diversidad de especies marinas. Araújo y colaboradores (2009), produjeron un listado morfológico de verificación basado en algas marinas bentónicas y cianobacterias del norte de Portugal tomando en nuevos registros, literatura referencias y datos del herbario. Posteriormente, Brito *et al.*, (2012), aisló y caracterizó 60 cepas de cianobacterias bentónicas de las costas portuguesas, utilizando caracteres morfológicos mediante microscopía óptica y electrónica, y métodos moleculares (secuencias génicas: ARNr 16S secuencia parcial, nifH, nifK, mcyA, mcyE/ndaF, sxtI). En Colombia y Latinoamérica hay pocos trabajos de identificación taxonómica e identificación molecular de cianobacterias marinas, generando un valor agregado a la clasificación de las cianobacterias del cepario LAUN como uno de los primeros ceparios funcionales de cianobacterias en Colombia, con potencial para posteriores desarrollos industriales. Por lo tanto, se railizó un registro fotográfico, molecular y filogenético de las cianobacterias consignadas en el cepario LAUN.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Obtención de la biomasa

Las cepas se obtuvieron del cepario LAUN de las accesiones 30 a la 82 correspondientes en su mayoría a los órdenes Synechococcales y Oscillatoriales, las cuales se activaron y masificarán en cajas de petri con los medios sólidos de cultivo con que se manejan en el cepario (marinas con ASNIII y aguas continentales con BG11), posteriormente, se transfirieron a reactores con medio liquido de 1L de volumen con burbujeo con aire ambiental microfiltrado. Los cultivos se realizaron en sistema Bach en fotobiorreactor con temperatura 23°C +/- 2°C, fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad, intensidad lumínica de 300 µmol m^{-2} s^{-1}(Darwich *et al.*, 2017), en el cuarto de cultivo del Laboratorio de Cultivo de Algas – UNAL.

2.2.2 Registro fotográfico

Las microfotografías fueron obtenidas con el microscopio óptico Leyca DM300 a un aumento de 1000X de cada una de las cepas de cianobacterias de la colección LAUN y procesadas con el paquete de procesamiento de imágenes “ImageJ2 by Fiji” de edición.

2.2.3 Desecación por Liofilización

El proceso de deshidratación por liofilización se realizó con el fin de garantizar la estabilidad del material genético y para facilitar la conservación, transporte y tratamiento del material para los procedimientos de extracción de ADN. Se utilizó el liofilizador de marca LABCONCO de 4,5 L de capacidad.

2.2.4 Extracción de ADN

Se siguió la metodología de extracción propuesta en el kit Invitrogen de extracción de ADN genómico de la casa Thermo Fisher Scientific “PureLink ™ Genomic DNA Mini Kit” adaptado a cianobacterias mediante tiempos de incubación de 4 horas en

el buffer de digestión “PureLink® Genomic Digestion Buffer” y proteinasa K, haciendo uso del material liofilizado y macerado en un mortero con nitrógeno líquido. El ADN genómico extraído fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso. Los análisis moleculares se realizaron en el Centro Interdisciplinario de Investigación Marina y Ambiental CIIMAR (Portugal).

2.2.5 Identificación molecular

A. PCR

La reacción de PCR en tiempo final se realizó tomando como diana el gen 16S ribosomal. Para ello, se estableció un volumen de reacción de 20µL con la siguiente composición: buffer para la polimerasa “5× Green GoTaq Flexi Buffer” a 1X, buffer de $MgCl_2$ a 2,5mM, mezcla de deoxinucleótidos fosfato (A, T, C, G) cada uno a 0.2mM, cada primer a 1,0µM, BSA a 10mg.mL^{-1}, ADNpolimerasa “of GoTaq Flexi DNA Polymerase a 0.5U/ µL y de 10 a 30ng de la cadena molde de ADN en un volumen de 2µL. Los primers utilizados para la amplificación fueron los primer universales 27F y 1494R propuestos por Neilan *et al.* (1997). El programa de PCR utilizado es el propuesto por Neilan *et al.*, (1997) y readaptado para Cianobacterias como se observa en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Programa de PCR para la amplificación del gen 16S de Cianobacterias

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización Inicial	95°C	120seg
35	Desnaturalización	95°C	60seg
	Anillamiento	55°C	45seg
	Extensión	72°C	60seg
1	Extensión Final	72°C	300seg
1	Holding	10°C	∞

B. Secuenciación

La secuenciación se realizó mediante reacción capilar Sanger en la empresa EuroFins (Alemania). Los productos de PCR fueron enviados por separado con el juego de primers 27F (Neilan *et al.*, 1997), 781R (Nübel *et al.*, 1997), 359F (Nübel *et al.*, 1997) y 1494R (Neilan *et al.*, 1997), siendo los primers 781R y 359F correspondientes a secuencias intermedias del gen 16S específicos de cianobacterias. Las secuencias en formato ".fasta" fueron procesadas por medio del programa Geneious prime V 2022.1 así mismo para el alineamiento múltiple de secuencias para cada muestra y obtención de secuencias consenso.

C. Filogenia

Los alineamientos múltiples para la elaboración del constructo filogénico de las secuencias problema y las secuencias tipo seleccionadas se realizaron en el programa MEGA 7.0. Mediante el método de Máxima Verosimilitud se infirió la historia evolutiva de las secuencias problema, el modelo probabilístico de sustitución que mejor se adaptó a las secuencias utilizadas corresponde al modelo Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980). El árbol filogenético resultante mostrado posee la probabilidad logarítmica más alta (-18986,70). Los taxones asociados se agruparon conforme al mayor porcentaje de árboles en los que estos coincidieron, estos valores se muestran junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias dicotómicas estimadas utilizando el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), y luego se seleccionó la topología con valor de verosimilitud superior. Para el modelado de las diferencias en las tasas evolutivas entre los sitios (5 categorías (+G, parámetro = 0,5501)), se utilizó una distribución Gamma discreta. El modelo de variación de la tasa evolutiva permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables ([+I], 28,88% de los sitios). El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas en función del número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 123 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 1210

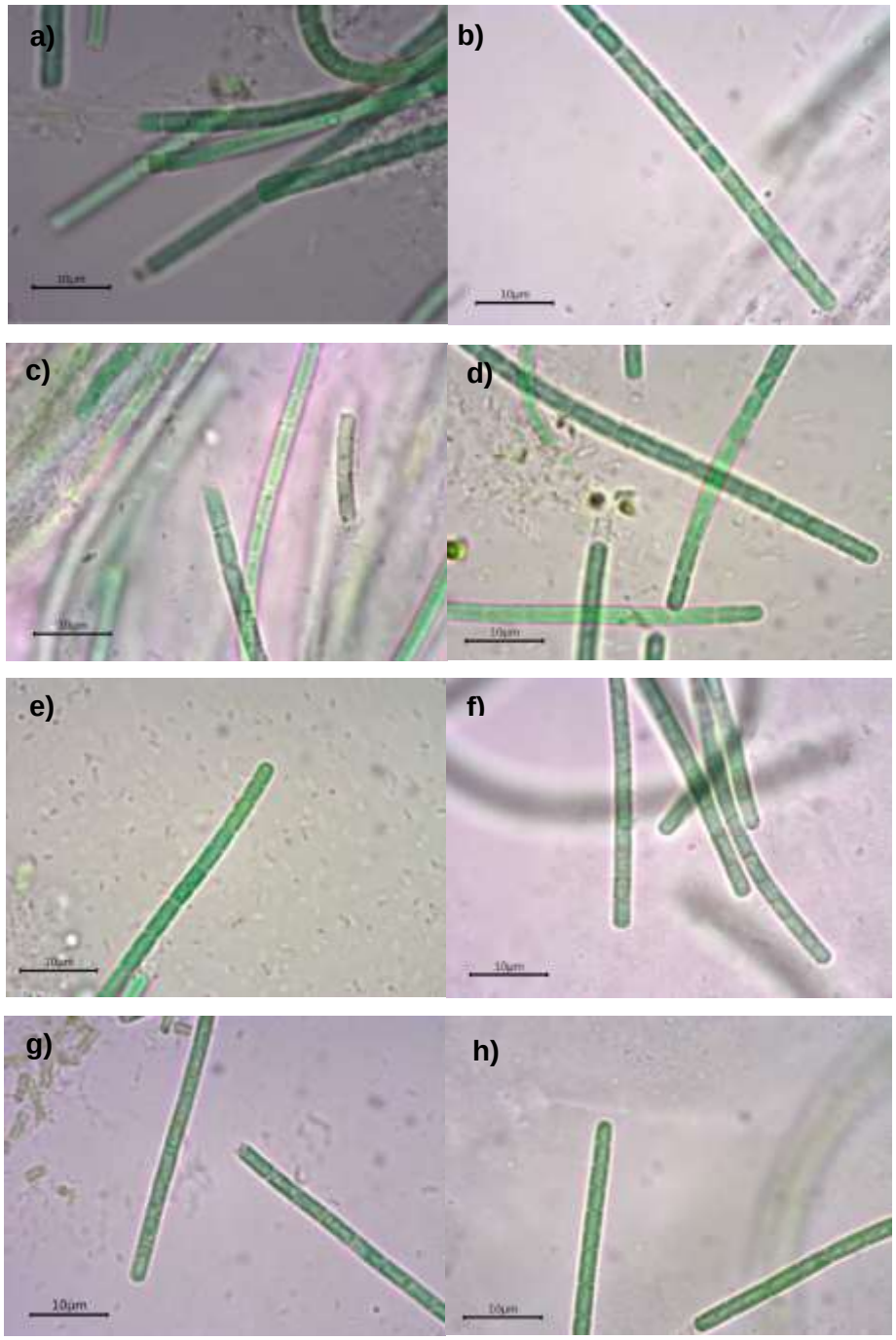
posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

2.3 Resultados

La clasificación taxonómica correspondientes a las 37 cepas de cianobacterias del cepario LAUN adelantadas por Cano (2018), Forero Cujiño (2019) y Peña (2019) corresponden, según Komárek *et al.*, (2014), a los órdenes Oscillatoriales (Figura 2-1), Pleurocapsales (Figura 2-2) y Synechococcales (Figura 2-3), esta clasificación es confirmada mediante análisis moleculares del gen 16S el cual fue alineado y cotejado en el NCBI mediante la herramienta BLASTn. Las micrografías obtenidas se muestran a continuación agrupadas según dicha clasificación.

A. Oscillatoriales.

Las cepas LAUN correspondientes a este orden pertenecen según análisis moleculares del gen 16S ribosomal al género *Geitlerinema*, actualmente aceptado como género *Baaleninema* según Samylina *et al.* (2021). El orden corresponde a aquellos taxones filamentosos con citología más complicada (con disposición radial, fasciculada o tilacoides irregulares), incluido también el género cocoide, filogenéticamente cercano *Cyanothece*. Órdenes con una disposición similar de tilacoides, talo azul verdoso, fino, liso y difluente, formando biopelículas. Filamentos solitarios, rectos o ligeramente ondulados, flexuosos. Tricomas móviles, cilíndricos, muy levemente contraídos en las paredes transversales, no atenuados hacia los extremos, a veces con vaina delgada e incolora, conteniendo un solo tricoma. Células cilíndricas, alargadas hasta 4 veces (rara vez isodiamétricas), (1,6) 3,2–5,0 (6,9) µm de largo y 1,2–2,8 (4,0) µm de ancho y gránulos de cianoficina en las paredes transversales. Célula apical redondeada, sin caliptra, ausencia de vacuolas de gas polar. La disposición de los tilacoides es parietal.


a)
b)
c)
d)
e)
f)
g)
h)
10µm

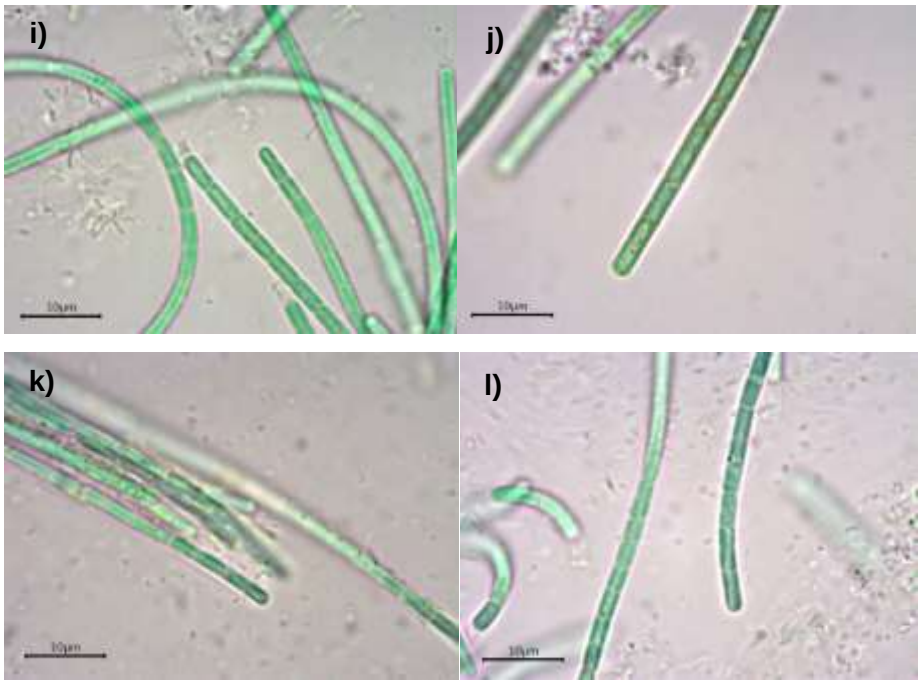


Figura 2-1: Micrografías ópticas a 1000X de las cianobacterias LAUN 31 (a), LAUN 32 (b), LAUN 33 (c), LAUN 37 (d), LAUN 38 (e), LAUN 41 (f), LAUN 42 (g), LAUN 43 (h), LAUN 44 (i), LAUN 45 (j), LAUN 46 (k), LAUN 47 (l), pertenecientes al orden Oscillatorialles. (género *Baaleninema*)

B. Pleurocapsales

Se observan células solitarias y grupos irregulares de células con adhesión al sustrato y entre sí, con células esféricas y piriformes hasta ovaladas de entre 5µm y 15µm. Alrededor de la pared celular se observan vainas incoloras y delgadas a nivel perimetral y de aspecto firme, el contenido de las células va desde un color verde pálido a rojizo pasando por tonalidades azules, células sin aerótopos (Komárek & Anagnostidis, 1998).

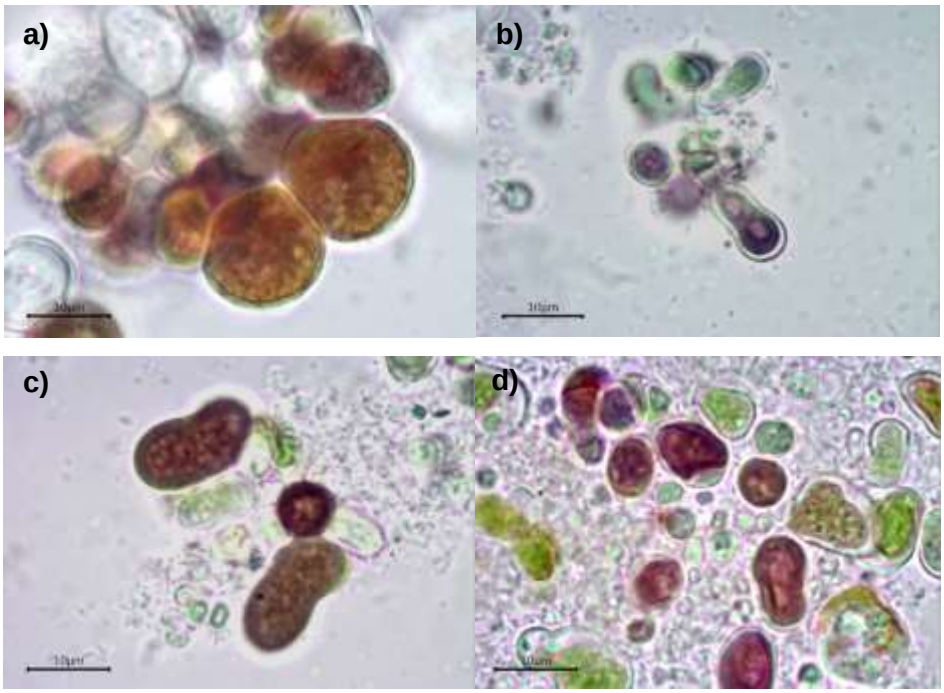
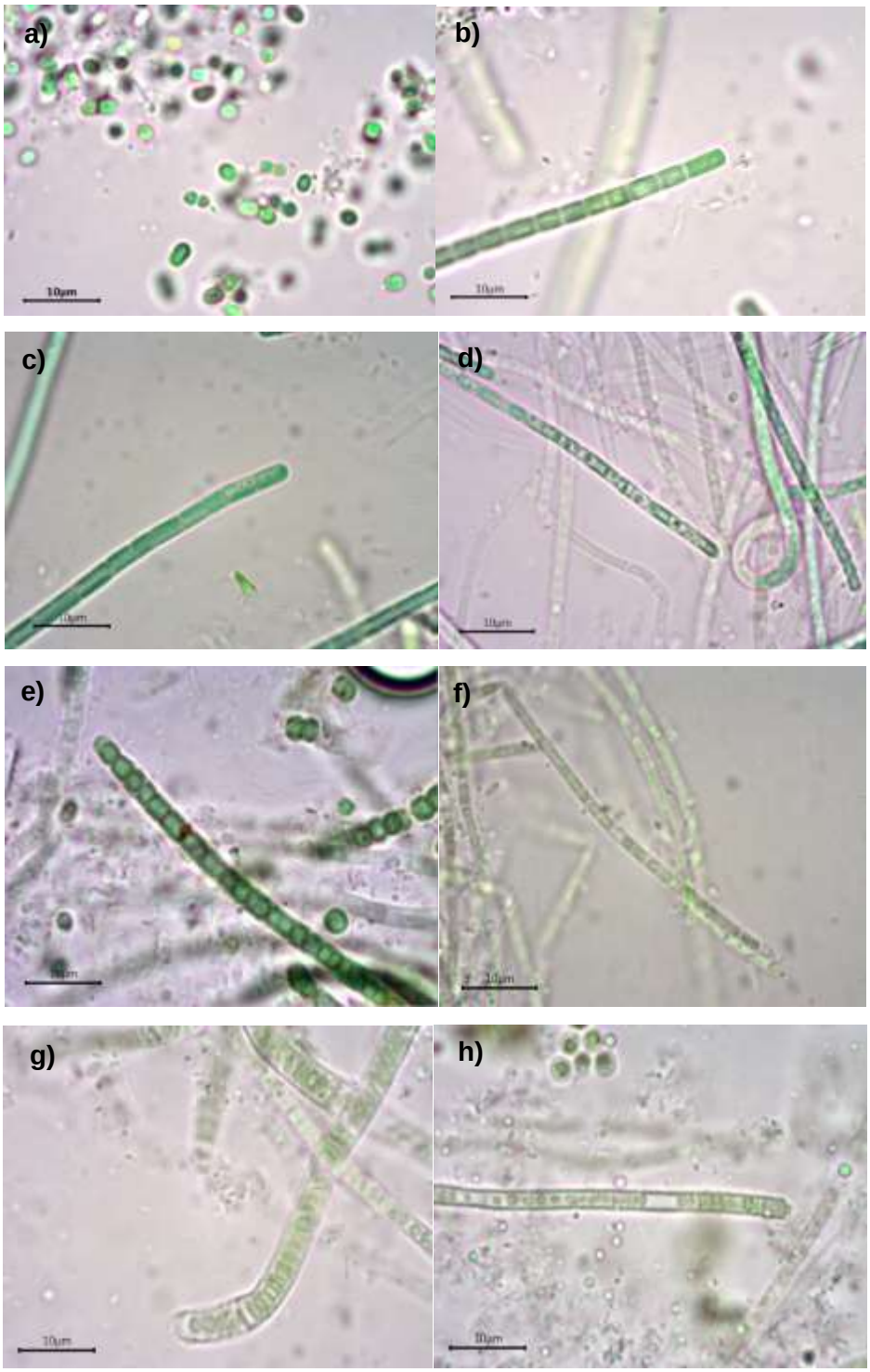
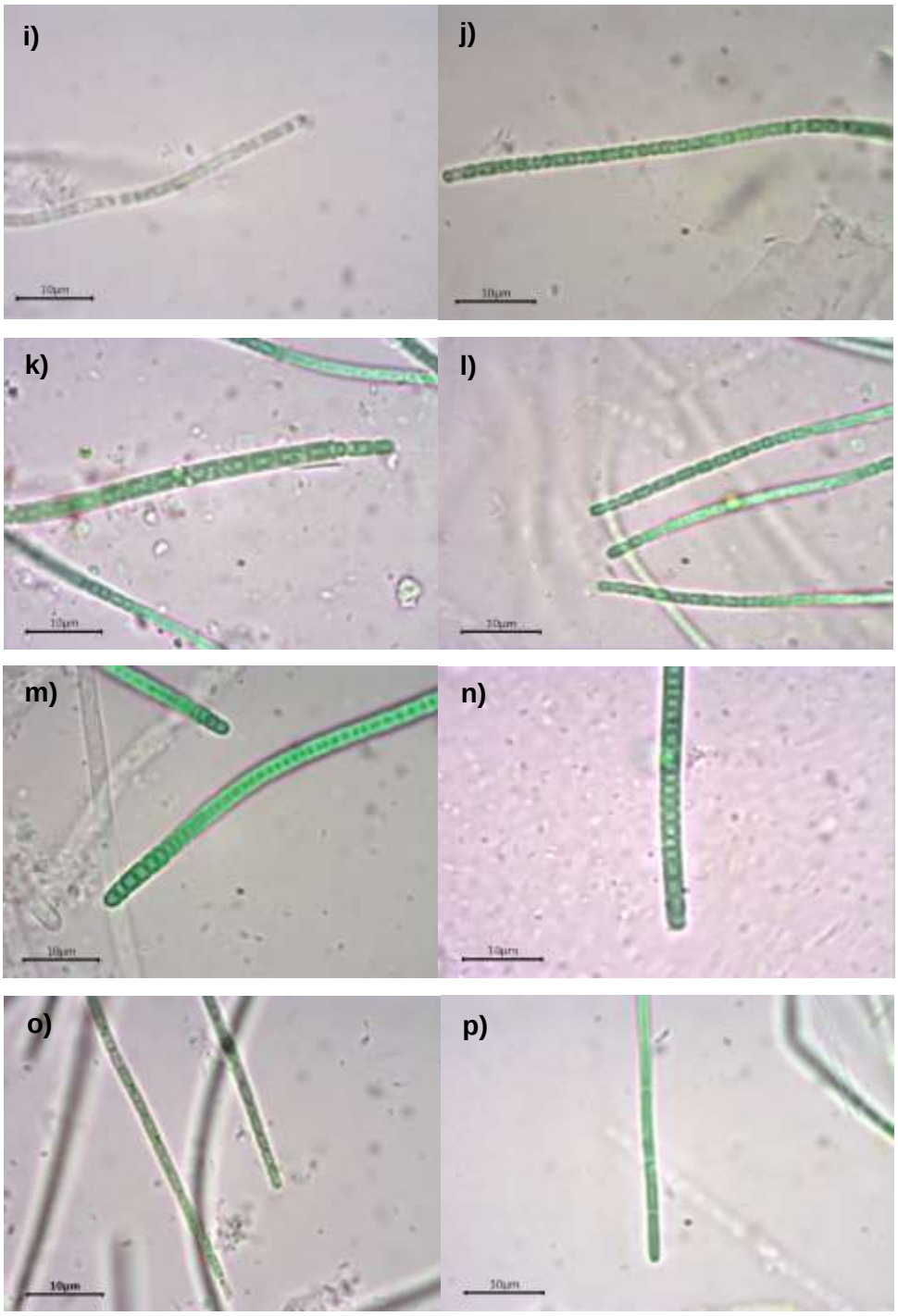


Figura 2-2: Micrografías ópticas a 1000X de las cianobacterias LAUN 34 (a), LAUN 78 (b), LAUN 79 (c), LAUN 82 (d), pertenecientes a cepas del orden Pleurocapsales.

C. Synechococcales

Se observan células coloniales filamentosas, en su mayoría con tricomas de 2 a 3µm de ancho y de 4 a 5µm de largo, filamentos isopolares. En la cepa LAUN 46 es evidente una vaina de alrededor de 2µm en la que se circunscribe el filamento. Según Komárek & Anagnostidis (2005), en general los filamentos son solitarios y se agregan en racimos, los tricomas son finos, cilíndricos y no son atenuados, las células apicales son redondeadas y no estrechadas, los tricomas carecen de movilidad, sin aerótopos, de células isodiamétricas con contenido homogéneo, células terminales sin engrosamientos en su pared o caliptra, sin heterocistos y acinetos presentes


a)
b)
c)
d)
e)
f)
g)
h)


i)
j)
k)
l)
m)
n)
o)
p)

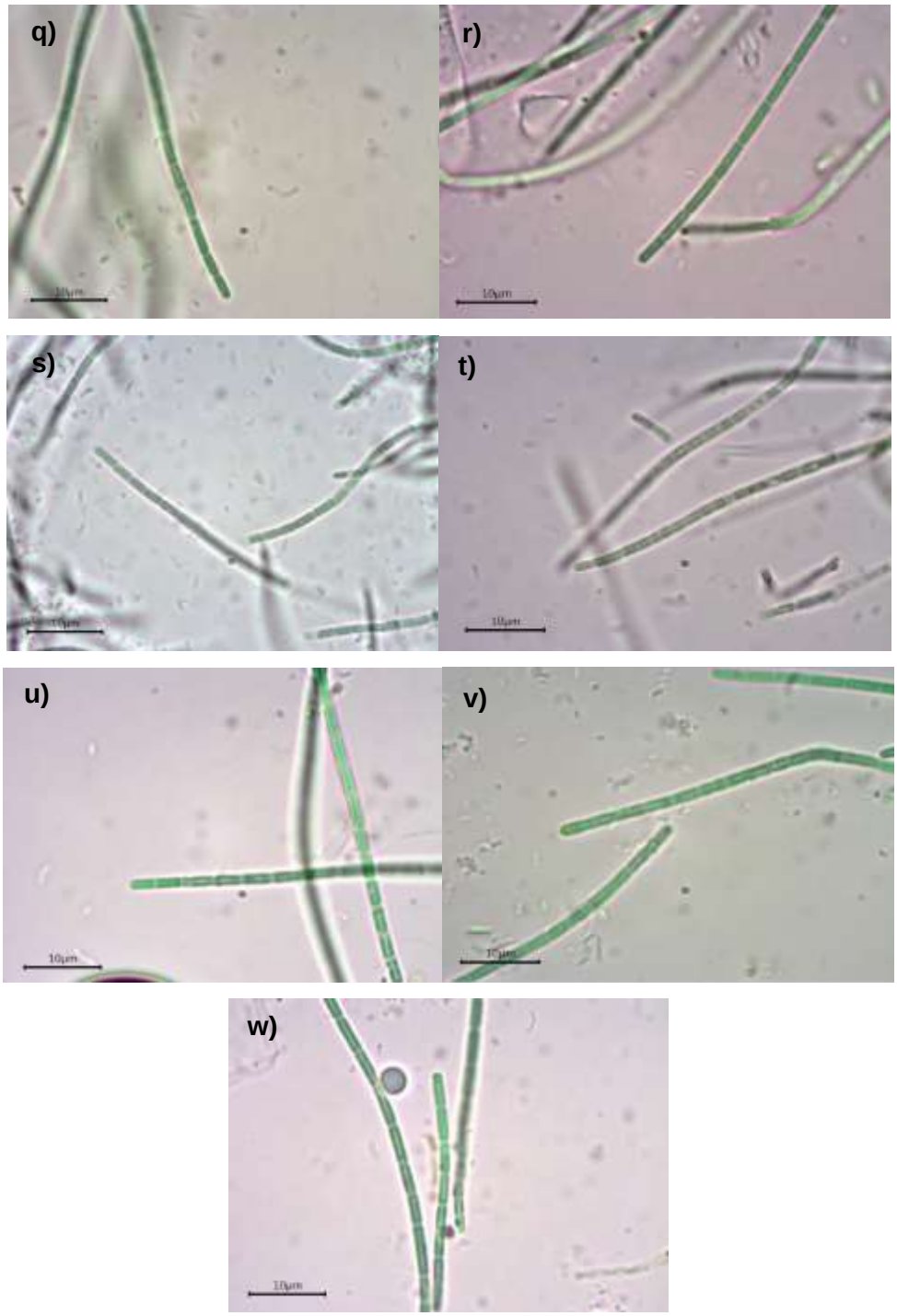


Figura 2-3: Micrografías ópticas a 1000X de las cianobacterias LAUN 29 (a), LAUN 35 (b), LAUN 48 (c), LAUN 54 (d), LAUN 55(e), LAUN 56 (f), LAUN 57 (g), LAUN 58 (h), LAUN 59 (i), LAUN 60 (j), LAUN 61 (k), LAUN 63 (l), LAUN 69 (m), LAUN 70 (n), LAUN 71 (o), LAUN 72 (p), LAUN 73 (q), LAUN 74 (r), LAUN 75 (s), LAUN 76 (t), LAUN 77 (u), LAUN 80 (v), LAUN 81 (w), pertenecientes al orden Synechococcales.

En la aproximación a la clasificación molecular mediante secuenciación del segmento 16S, correspondiente a la subunidad menor del ribosoma, se obtuvo

una composición de la colección LAUN obteniendo la siguiente clasificación (Tabla 2-2):

Tabla 2-2: Clasificación molecular de las cepas LAUN

Código	Coincidencia (NCBI)	% de identidad	Identificación (basado en el árbol filogenético y la distancia-P)	Nota	Longitud de la secuencia
LAUN 29	*Synechococcus* sp. PCC 73109 (GCF_001521855)	100%	*Synechococcus* sp. LAUN 29	Synechoccocales	1489
LAUN 31	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 31	Probablemente *Baaleninema simplex*	1347
LAUN 32	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 32	Probablemente *Baaleninema simplex*	1347
LAUN 33	*Geitlerinema* sp. Flo1 (FJ042947)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 33	Probablemente *Baaleninema simplex*	1347
LAUN 34	*Pleurocapsa* sp. PCC 7314 (AB074511)	96.38%	*Pleurocapsa* sp. LAUN 34	Pleurocapsales	1285
LAUN 35	*Leptolyngbya* sp. YACCYB525 (MH683778)	92.70%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 35	**Probablemente genero nuevo**	1343
LAUN 37	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 37	Probablemente *Baaleninema simplex*	1347
LAUN 38	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 38	Probablemente *Baaleninema simplex*	1342
LAUN 41	*Geitlerinema* sp. Flo1 (FJ042947)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 41	Probablemente *Baaleninema simplex*	1342
LAUN 42	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 42	Probablemente *Baaleninema simplex*	1342
LAUN 43	*Geitlerinema* sp. Flo1 (FJ042947)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 43	Probablemente *Baaleninema simplex*	1337
LAUN 44	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 44	Probablemente *Baaleninema simplex*	1349
LAUN 45	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 45	Probablemente *Baaleninema simplex*	1347
LAUN 46	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 46	Probablemente *Baaleninema simplex*	1352
LAUN 47	*Baaleninema simplex* PCC 7105 (NR_172655)	100%	*Baaleninema* sp. LAUN 47	Probablemente *Baaleninema simplex*	1112
LAUN 54	*Oscillatoriales cyanobacterium* (FJ790609)	80.68%	*Synechococcales cyanobacterium LAUN 54*	**Probablemente genero nuevo**	1375

LAUN 55	*Leptolyngbya boryana* PMC 883.14 (MT984284)	93.37%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 55	**Probablemente genero nuevo**	1324
LAUN 56	*Leptolyngbya sp. LLi18*/*Oculatella* sp. LLi18 (DQ786166)	93.51%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 56	**Probablemente genero nuevo**	1320
LAUN 58	*Leptolyngbya sp. LLi18*/*Oculatella* sp. LLi18 (DQ786166)	93.55%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 58	**Probablemente genero nuevo**	1357
LAUN 59	*Leptolyngbya sp. LLi18*/*Oculatella* sp. LLi18 (DQ786166)	93.57%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 59	**Probablemente genero nuevo**	1349
LAUN 60	*Leptolyngbya sp. LLi18*/*Oculatella* sp. LLi18 (DQ786166)	93.59%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 60	**Probablemente genero nuevo**	1355
LAUN 61	*Uncultured cyanobacterium* (JQ612141)	94.47%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 61	**Probablemente genero nuevo**	1168
LAUN 63	*Leptolyngbya sp. LLi18*/*Oculatella* sp. LLi18 (DQ786166)	93.70%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 63	**Probablemente genero nuevo**	1328
LAUN 69	*Leptolyngbya* cf. *boryana* Ru-1-5 (MH688846)	100%	*Leptolyngbya* sp. LAUN 69	Probablemente *Leptolyngbya boryana*	1296
LAUN 70	*Leptolyngbya* cf. *boryana* Ru-1-5 (MH688846)	100%	*Leptolyngbya* sp. LAUN 70	Probablemente *Leptolyngbya boryana*	1300
LAUN 71	*Leptolyngbya sp. Sai001* (GU935349)	93.33%	*Synechococcales cyanobacterium LAUN 71*	**Probablemente genero nuevo**	1287
LAUN 72	*Phormidium* sp. BDU 20391 (KU958135)	99.91%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 72	**Probablemente genero nuevo**	1059
LAUN 73	*Phormidium* sp. BDU 20391 (KU958135)	99.93%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 73	**Probablemente genero nuevo**	1360
LAUN 74	*Phormidium* sp. BDU 20391 (KU958135)	99.93%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 74	**Probablemente genero nuevo**	1360
LAUN 75	Filamentous cyanobacterium LEGE 07170 (KU951854)	99.73%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 75	**Probablemente genero nuevo**	1129
LAUN 76	*Phormidium* sp. BDU 20391 (KU958135)	99.93%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 76	**Probablemente genero nuevo**	1360
LAUN 77	*Phormidium* sp. BDU 20391 (KU958135)	99.93%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 77	**Probablemente genero nuevo**	1363
LAUN 78	*Hyella patelloides* LEGE 07179 (HQ832901)	96.99%	*Hyella* sp. LAUN 78	Pleurocapsales	1364

LAUN 79	*Dermocarpa* sp. MBIC10001 (AB058199)	97.85%	*Stanieria* sp. LAUN 79	Pleurocapsales	1300
LAUN 80	*Phormidium* sp. BDU 20391 (KU958135)	99.93%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 80	**Probablemente genero nuevo**	1363
LAUN 81	*Phormidium* sp. BDU 20391 (KU958135)	99.93%	Synechococcales cyanobacterium LAUN 81	**Probablemente genero nuevo**	1361
LAUN 82	*Hyella patelloides* LEGE 07179 (HQ832901)	97.69%	*Hyella* sp. LAUN 82	Pleurocapsales	1080

A partir de la construcción y análisis filogenético (Figura 2-4), se obtuvieron veintiuno cepas pertenecientes al orden de las Synechoccocales, de las cuales, dieciocho según las distancias filogenéticas que presentan con los demás integrantes del orden, podrían constituir seis nuevos géneros para Colombia, las tres cepas restantes corresponden a representantes de los géneros *Synechoccocus* y *Leptolyngbya*. Las doce cepas pertenecientes al orden de las *Oscillatoriales* corresponden al género *Baaleninema*. Cuatro cepas pertenecen al orden de las Pleurocapsales con representantes del género *Pleurocapsa*, *Hyella* y *Stanieria,* tal como se puede apreciar en el constructo filogénico.

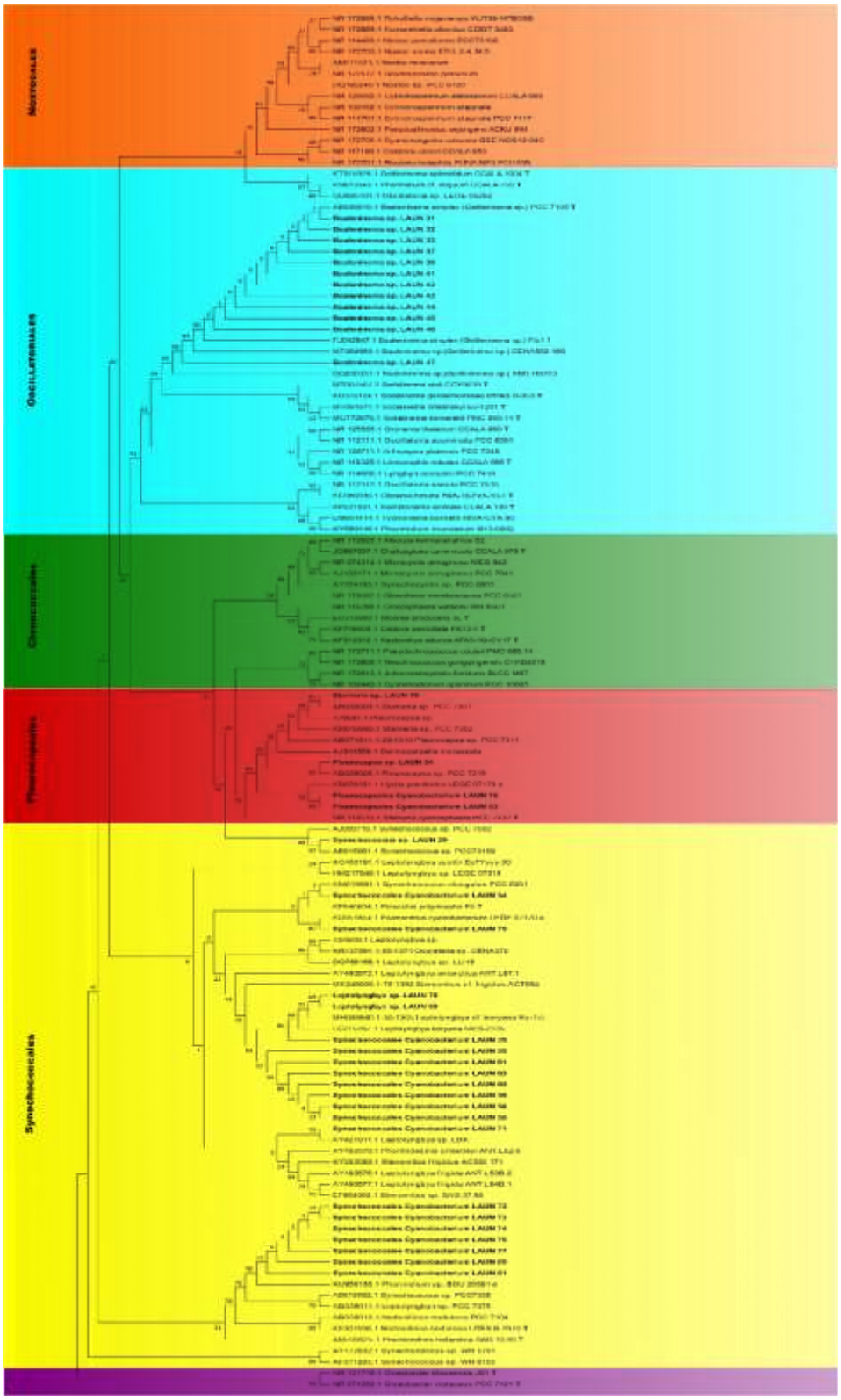


Figura 2-4: Árbol Filogenético de las cepas LAUN

2.4 Discusión

El análisis morfológico (Cano, 2018; Forero Cujiño, 2019; Peña, 2019) y filogenético de las 37 cepas de cianobacterias colombianas analizadas muestra que la composición de cepas consignadas a la fecha en la Colección LAUN, están constituidas por los órdenes de cianobacterias Synechoccocales, Oscilatoriales y Pleurocapsales con una representatividad de 21, 12 y 4 cepas respectivamente (Figura 2-5).

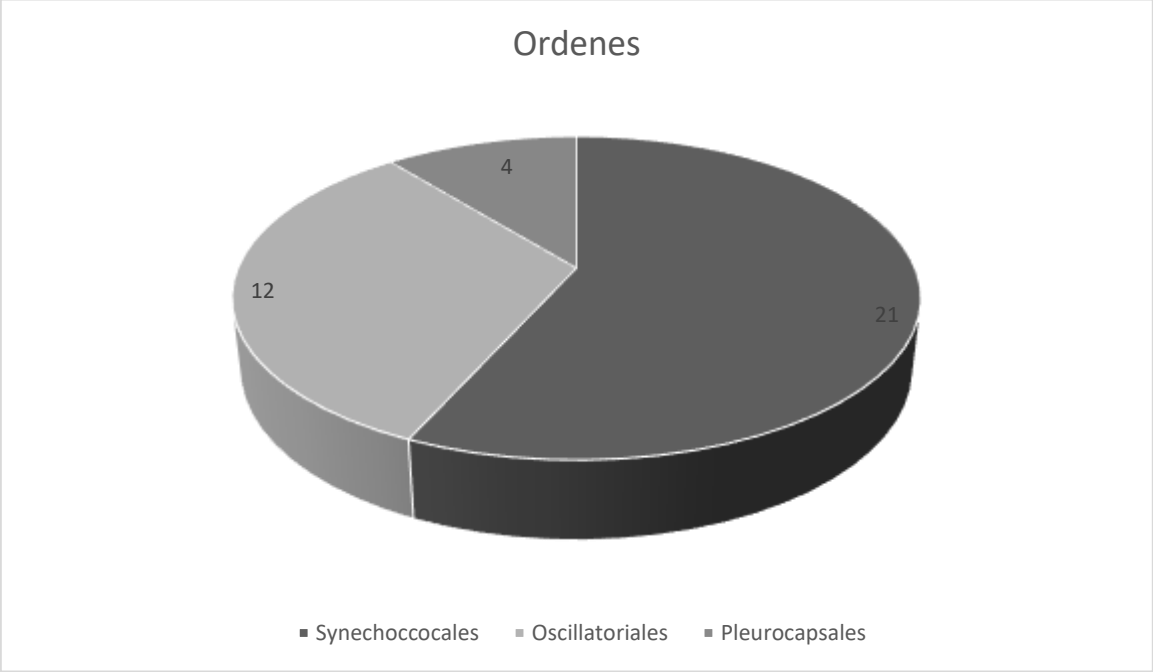


Figura 2-5: Composición morfológica y filogenética de cianobacterias del cepario LAUN

En el análisis comparativo taxonómico (Cano, 2018; Forero Cujiño, 2019; Peña, 2019) y molecular del gen 16S ribosomal de las cepas del cepario LAUN encontramos que para ambientes marinos entre las islas de caribe San Andrés y Providencia, la cepa LAUN29 corresponde con un 100% de identidad a la accesión PCC 73109 (GenBank: GCF_001521855) correspondiente a *Synechoccocus sp.*(Honda *et al.*, 1999) del NCBI. Así mismo LAUN 31, LAUN 32, LAUN 33, LAUN 37, LAUN 38, LAUN 41, LAUN 42, LAUN 43, LAUN 44, LAUN 45, LAUN 46 y LAUN 47 poseen una identidad del 98% en el NCBI con la secuencia

tipo correspondiente a *Baaleninema simplex* (GenBank: NR_172655), género y especie descrita recientemente por Samylina *et al.*, (2021) y siendo posiblemente el primer reporte de este género en las costas colombianas. En el país, se han realizado aproximaciones a la composición y estructura florística de la costa caribe colombiana (Cano, 2018; Castilla Corrales, 2019; Peña, 2019; Puyana *et al.*, 2019) a nivel molecular y morfológico se llegan a los mismos ordenes, encontrando una alta representatividad de Oscillatoriales, siendo *Phomidium, Lyngbya* y *Oscillatoria* los géneros con mayor representatividad. Castilla Corrales (2019) y Puyana *et al.* (2019), reportan representantes formantes de afloramientos/biopelículas en estos géneros y algunas cepas con potencial toxigénico.

LAUN35 y LAUN71 corresponden taxonómicamente a *Leptolyngbya boryana* (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988 (Cano, 2018) y molecularmente presentan una homología del 92.7% con la cepa *Leptolyngbya sp*. Anagnostidis & Komárek 1988, con código de cepario YACCYB525 (GenBank: MH683778) y 93.33% con la cepa *Leptolyngbya sp.* con código de cepario Sai001 (GenBank: GU935349). Filogenéticamente se encuentran cercanas a las Leptolyngbyaceae sin embargo en el constructo filogenético elaborado, LAUN35 y LAUN71 no tienen nada directamente semejante con respecto a las secuencias de referencia resaltando que se seleccionaron 9 secuencias tipo para *Leptolyngbya* siendo más cercanas a *L. boriana* Komárek & Anagnostidis 1998 y *L. frigida* Anagnostidis & Komárek 1988 con un 86% y 35% de probabilidad respectivamente, constituyendo por si solas dos posibles nuevos géneros. Puyana *et al.* (2019), en estudios de alelopatía con corales en Islas del Rosario reportan la presencia de cianobacterias del orden Oscillatoriales con actividad toxica sobre cnidarios y crustáceos, los autores identifican taxonómicamente a *Symploca hydnoides*, *Phormidium submembranaceum, Lyngbya spp, Oscillatoria spp, Oscillatoria acuminata, Lyngbya majuscula, Lyngbya sórdida y Oscillatoria margaritifera*. Coincidiendo con los morfotipos consignados en el cepario LAUN, sin embargo los autores no realizan comparaciones moleculares para confirmar los géneros y especies, basándose únicamente en taxones morfológicos los cuales pueden llegar a ser subjetivos al observador y en ocasiones arbitrarios (Komárek *et al.*, 2014) teniendo

que necesariamente apoyar dichas clasificaciones taxonómicas en análisis filogenéticos y proporcionando clasificaciones de mayor fiabilidad.

La cepa marina LAUN34, colectada en aguas costeras del caribe colombiano en las islas de San Andrés y Providencia, tiene una identidad de 96.38% con la cepa PCC7314 correspondiente a *Pleurocapsa sp.* Thuret, 1885 (GenBank: AB074511), en cuanto a su relación filogenética con PCC7314 se encuentra que existe un 20% de discordancia en el constructo filogenético en relación con la secuencia de mayor homología en el NCBI, según Komárek *et al.* (2014), y Shalygin *et al.* (2019), el orden Pleurocapsales parece tener un origen monofilético respecto a la información disponible del orden, en consecuencia, esto podría sugerir que la cepa LAUN34 pertenece a un género de pleurocapsales aun no descrito. De la misma forma, la cepa marina LAUN79 de aguas costeras del Departamento de Bolívar, posee una identidad del 97.26% con la cepa *Dermocarpa* P.Crouan & H.Crouan 1858, con código de cepario MBIC10001 (GenBank: AB058199) y una congruencia filogenética del 81% en el constructo elaborado, indicando que esta cepa también podría constituir un nuevo género de Pleurocapsales, por último, encontramos en este orden a las cepas marinas LAUN78 y LAUN82 las cuales comparten origen con la cepa LAUN79 y poseen una identidad del 97 y 97,7% con la cepa *Hyella patelloides* V.Ramos, Â.Brito & Kaštovský 2017, con código de cepario LEGE 07179 (GenBank: HQ832901) descrita por Brito *et al.*, (2017), y cuya correspondencia es consecuente en el constructo filogenético en un 98% con la referencia LEGE 07179. En Colombia existen alrededor de 4 estudios que relacionan la región caribe con el orden Pleurocapsales (Cano, 2018; Castilla Corrales, 2019; Peña, 2019; Prato-Valderrama, 2013) siendo LAUN34,LAUN78, LAUN79 y LAUN82 accesiones del cepario derivadas de los trabajos de Cano (2018) y Peña (2019) mientras que en el estudio de Prato-Valderrama (2013) se relacionan los géneros *Dermocapsa* y *Pleurocapsa* en las Islas del Rosario y en el estudio de Castilla Corrales (2019) se reporta el género *Xenococcus* en las islas de San Andrés y Providencia. Por lo tanto, las accesiones aquí reportadas corresponden a nuevos registros de estos organismos en el país y por los

resultados moleculares y filogenéticos se pueden proponer como géneros nuevos de Pleurocapsales a las cepas LAUN78 y LAUN82.

Finalmente, el resto de las cepas LAUN corresponden al orden Synechococcales, con la particularidad de que en su gran mayoría constituyen especies nuevas y probablemente géneros nuevos. La cepa LAUN 54 corresponde en un 80.68% de homología con la cepa Oscillatoriales cyanobacterium FJ790609 (GenBank: FJ790609), filogenéticamente existe una cercanía del 7% con la cepa de referencia *Synechococcus elongatus* (Nägeli) Nägeli 1849, con código de cepario PCC6301 (NCBI Reference Sequence: NR_074309), lo anterior evidencia de un posible nuevo género. Las cepas LAUN55 corresponde con un 93.4% de homología con la cepa *Leptolyngbya boryana* PMC 883.14 (GenBank: MT984284.1), especie descrita por Anagnostidis & Komárek (1988), y la cepa en específico descrita por Duval *et al.* (2020), así mismo, en el constructo filogenético LAUN55 se observa una congruencia del 50% con *Leptolyngbya boryana* y además se ubica unida en un 97% a un cluster de otras cianobacterias LAUN (LAUN 56, LAUN 58, LAUN 59, LAUN 60 LAUN 61 y LAUN 63)(Figura 2-4), esto posiblemente es evidencia de un nuevo género con 2 posibles especies de cianobacterias filamentosas de alta montaña en Colombia. Por otra parte, las cepas LAUN56, LAUN 58, LAUN 59, LAUN 60 y LAUN 63 poseen una homología del 93.6% en promedio con la cepa *Leptolyngbya sp*. con código de cepario LLi18 (GenBank: DQ786166), sin embargo, en el árbol filogenético la cepa *Leptolyngbya sp*. LLi18 se encuentra separada por varias ramas de las cepas LAUN en cuestión y que estas cepas alcanzan una congruencia del 100% entre si lo que posiblemente las puede ubicar a todas como una única especie. Así mismo se encontró que las cepas LAUN69 y 70 corresponden a cianobacterias de aguas continentales que corresponden taxonómicamente a *Leptolyngbya sp.* con la mayor cercanía filogenética a *Leptolyngbya boriana* con un 100% de probabilidad, constituyendo posiblemente la misma especie. En Colombia existen alrededor de 5 reportes publicados para este orden de los cuales 4 corresponden a Synechococcales marinas (Cano, 2018; Castilla Corrales, 2019; Peña, 2019; Prato-Valderrama, 2013) y uno solo a cianobacterias de este género en aguas

continentales (Forero Cujiño, 2019), estudio del cual derivan las cepas LAUN 54, LAUN 55, LAUN 56, LAUN 58, LAUN 59, LAUN 60, LAUN 61, LAUN 63, LAUN 69, LAUN 70 LAUN 71 utilizadas en esta investigación.

Encontramos también en el mismo orden Synechococcales, otro cluster de cianobacterias LAUN que molecularmente se identificaron como cianobacterias filamentosas Oscillatoriales del género *Phormidium* Kützing ex Gomont 1892, de ambientes marinos, propiamente en Islas del Rosario, cercanas a las costas del Departamento de Bolívar, siendo las cepas LAUN72, LAUN 73, LAUN 74, LAUN 76, LAUN 77, LAUN 80 y LAUN 81 (Peña, 2019), que presentan homología del 99.9% con la cepa *Phormidium sp*. con código de cepario BDU 20391 (GenBank: KU958135) en el NCBI y que en el constructo filogenético ubica las 7 cepas con un 96% de probabilidad junto a *Phormidium sp*. BDU 20391, sin embargo, *Phormidium sp*. BDU 20391 es una cianobacteria sin clasificar y filogenéticamente se ubica en el orden de las Synechococcales (no Oscillatoriales) por lo que se infiere una incorrecta clasificación de la cepa y por lo tanto se puede decir que es probable que el cluster corresponda a un nuevo género. En la región caribe, Cano, (2018), Prato-Valderrama, (2013) y Castilla Corrales, (2019) reportan la presencia de *Synechococcus sp., Synechocystis sp*. y *Heteroleibleinia epiphytica* entre las islas de San Andrés, Providencia e Islas del Rosario.

Por último, encontramos que la cepa filamentosa LAUN75 presenta un 99,7% de homología con la cepa Filamentous cyanobacterium con código de cepario LEGE 07170 (GenBank: KU951854.1) en su secuencia en el NCBI y filogenéticamente se ubican ambas en la misma rama con un 97% de probabilidad, esto indica que existe una alta probabilidad de que ambas cepas se traten de la misma especie y que esta especie constituya probablemente un género nuevo dentro de las Synechococcales.

Para confirmar los nuevos géneros y especies son necesarios análisis moleculares comparativos más robustos como estructuras secundarias autocomplementarias derivadas de las secuencias de las regiones ITS intermedias entre el gen 16S y

23S ribosomal, así mismo análisis comparativos del gen 23S sumados a los ya realizados al gen 16S

2.5 Conclusiones

El estudio de la diversidad colombiana de cianobacterias es muy pobre, lo que se demuestra con el bajo número de trabajos realizados hasta el momento.

En el presente trabajo se encontró siete posibles nuevos géneros y 23 posibles nuevas especies. Las accesiones de la Colección LAUN corresponden a los órdenes Oscillatoriales (LAUN 31, LAUN 32, LAUN 33, LAUN 37, LAUN 38, LAUN 41, LAUN 42, LAUN 43, LAUN 44, LAUN 45, LAUN 46, LAUN 47), Synechococcales (LAUN 29, LAUN 35, LAUN 48, LAUN 54, LAUN 55, LAUN 56, LAUN 57, LAUN 58, LAUN 59, LAUN 60, LAUN 61, LAUN 63, LAUN 69, LAUN 70, LAUN 71, LAUN 72, LAUN 73, LAUN 74, LAUN 75, LAUN 76, LAUN 77, LAUN 80, LAUN 81) y Pleurocapsales (LAUN 34, LAUN 78, LAUN 79, LAUN 82).

El conocimiento de la diversidad de la microbiota de cianobacterias de los ecosistemas Colombianos, con relación a su composición, estructura, sus posibles roles ecológicos pueden llevar al conocimiento del potencial biotecnológico de cada una de estas especies (muchas aún desconocidas para la ciencia) y pueden abrir la puerta a un amplio abanico de posibilidades y aplicaciones en múltiples industrias (nutraceútica, textiles, farmacológica, servicios ecosistémicos, etc.) que puedan impulsar el desarrollo sostenible del país.

2.6 Bibliografía

Anagnostidis, K. & Komárek, J.. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3-Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. Suppl.. 80. 1-4.

Araújo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P. D., Pereira, R., Santos, R., & Pinto, I. S. (2009). Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina*, *52*(1), 24–46. https://doi.org/10.1515/BOT.2009.026

Bravakos, P., Kotoulas, G., Skaraki, K., Pantazidou, A., & Economou-Amilli, A. (2016). A polyphasic taxonomic approach in isolated strains of Cyanobacteria from thermal springs of Greece. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *98*, 147–160. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.009

Brito, Â., Ramos, V., Mota, R., Lima, S., Santos, A., Vieira, J., Vieira, C. P., Kaštovský, J., Vasconcelos, V. M., & Tamagnini, P. (2017). Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *111*, 18–34. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.03.006

Brito, Â., Ramos, V., Seabra, R., Santos, A., Santos, C. L., Lopo, M., Ferreira, S., Martins, A., Mota, R., Frazão, B., Martins, R., Vasconcelos, V., & Tamagnini, P. (2012). Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: A polyphasic study. *Systematic and Applied Microbiology*, *35*(2), 110–119. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.07.003

Cano, J. (2018). Conservación in vitro y cultivo de Cyanoprocariotas bentónicas arrecifales de Providencia y Santa Catalina Islas, Colombia. Tesis de Maestría. In *Universidad Nacional de Colombia*.

Castilla Corrales, M. B. (2019). *Caracterización florística de cianobacterias y macroalgas marinas de los bancos Roncador y Serrana del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Mar Caribe colombiano*.

Criscuolo, A., & Gribaldo, S. (2011). Large-Scale phylogenomic analyses indicate a deep origin of primary plastids within cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(11), 3019–3032. https://doi.org/10.1093/molbev/msr108

Darwich, M., Peña, E., Montenegro, L., & Benitez, N. (2017). *Evaluación del consorcio natural alga(Parachlorella kessleri)(CHLOROPHYCEAE)- bacteria en depuración de aguas residuales sintéticas*. Universidad del Valle.

De Figueiredo, D. R., Reboleira, A. S. S. P., Antunes, S. C., Abrantes, N., Azeiteiro, U., Gonçalves, F., & Pereira, M. J. (2006). The effect of environmental parameters and cyanobacterial blooms on phytoplankton dynamics of a Portuguese temperate lake. *Hydrobiologia*, *568*(1), 145–157. https://doi.org/10.1007/s10750-006-0196-y

Duval, C., Hamlaoui, S., Piquet, B., Toutirais, G., Yéprémian, C., Reinhardt, A., Duperron, S., & Marie, B. (2020). Characterization of cyanobacteria isolated from thermal muds of Balaruc- Les-Bains (France) and description of a new genus and species Pseudo- chroococcus couteii. *BioRxiv*.

Forero Cujiño, M. A. (2019). *Determinación de Cyanoprokaryotas planctónicas y su potencial en la producción de cianotoxinas en un embalse de la sabana de Bogotá - Colombia*.

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

Honda, D., Yokota, A., & Sugiyama, J. (1999). Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine Synechococcus strains. *Journal of Molecular Evolution*, *48*(6), 723–739. https://doi.org/10.1007/PL00006517

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120. https://doi.org/10.1007/BF01731581

Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, *86*(4), 295–335.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7). https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Lopes, V. R., Ramos, V., Martins, A., Sousa, M., Welker, M., Antunes, A., & Vasconcelos, V. M. (2012). Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Marine Environmental Research*, *73*, 7–16. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.005

Machado Lima, N. M. (2020). *Diversidade e distribuição de cianobactérias de crostas biológicas do bioma caatinga com base em taxonomia polifásica e análise metagenômica*. 1–178. https://repositorio.unesp.br/handle/11449/194221%0Ahttp://hdl.handle.net/11449/194221

Neilan, B. A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T., & Goodman, A. E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *47*(3), 693–697. https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-693

Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(8), 3327–3332. https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3327-3332.1997

Peña, J. (2019). *Potencial biotecnológico de Cianoprocariotas provenientes de*

Islas del Rosario, Colombia. 135.

Potts, M., & Whitton, B. A. (2012). Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. In *Ecology of Cyanobacteria II*.

Prato-Valderrama, J. A. (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.*

Puyana, M., Prato, J. A., Nieto, C. F., Ramos, F. A., Castellanos, L., Pinzón, P., & Zárate, J. C. (2019). Experimental approaches for the evaluation of allelopathic interactions between hermatypic corals and marine benthic cyanobacteria in the colombian caribbean. *Acta Biologica Colombiana*, *24*(2), 243–254. https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.72706

Samylina, O. S., Sinetova, M. A., Kupriyanova, E. V., Starikov, A. Y., Sukhacheva, M. V., Dziuba, M. V., & Tourova, T. P. (2021). Ecology and biogeography of the “marine Geitlerinema” cluster and a description of Sodalinema orleanskyi sp. nov., Sodalinema gerasimenkoae sp. nov., Sodalinema stali sp. nov. And Baaleninema simplex gen. et sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiology Ecology*, *97*(8), 1–25. https://doi.org/10.1093/femsec/fiab104

Shalygin, S., Kavulic, K., & Pietrasiak, N. (2019). Neotypification of Pleurocapsa fuliginosa and epitypification of P . minor (Pleurocapsales): resolving a polyphyletic cyanobacterial genus. *Carroll Collected*.

Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., & Tenreiro, R. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*, *155*(2), 642–656. https://doi.org/10.1099/mic.0.022848-0

3. Capítulo 3: Evaluación Bioquímica de Cianobacterias de la colección LAUN

3.1 Introducción

La población mundial continúa en aumento, por consiguiente, aumenta la demanda energética, de alimentos, fármacos, pigmentos, productos cosméticos, etc., siendo las microalgas y cianobacterias de las fuentes más significativas de estos recursos, dada su amplia capacidad de producción de sustancias bioquímicas, bioactivas y novedosas para generar investigaciones y productos en las industrias alimentaria, agrícola, energética y farmacéutica logrando de esta manera, una intensificación de los esfuerzos académicos industriales y análisis tecno-económicos alrededor de las tecnologías de producción de estos microorganismos (Hachicha *et al.,* 2022; Lin *et al.,* 2020; Villalta-romero *et al.,* 2019).

La biomasa de microalgas y en este caso cianobacterias, representa una interesante fuente nutricional para el sector agropecuario e inclusive en nutrición humana. La composición bioquímica de las microalgas (vitaminas, minerales, ácidos grasos, proteínas, carbohidratos y antioxidantes) puede ser considerada como un alimento funcional, ya que complementan la función nutritiva y ayudan a la prevención de ciertas enfermedades (Villalta-romero *et al.,* 2019).

Las cianobacterias son organismos procariotas con capacidad fotosintética, usan la luz solar, CO_2, agua y trazas de distintos minerales para crecer. Al compararlas con las plantas terrestres, estas son más eficientes al producir biomasa y al utilizar la energía solar (Lin *et al.,* 2020), facilitando la producción de múltiples metabolitos de potencial interés y uso comercial, como proteína o pigmentos, siendo las ficobiliproteínas los más destacables, son pigmentos fotosintéticos accesorios que se agregan en la célula en estructuras denominadas ficobilisomas, anclados a la membrana del tilacoide (İlter *et al.,* 2018). Las ficobiliproteínas de las

cianobacterias se pueden dividir en tres clases: ficoeritrina (rosa brillante, rojo), ficocianina (PC) (azul oscuro) y aloficocianina (azul claro). Estas ficobiliproteínas son ampliamente usadas en fármacos, alimentos, cosméticos y materiales fluorescentes (İlter *et al.,* 2018). Con respecto a las proteínas, siendo las microalgas y cianobacterias la fuente de obtención, requiere un enfoque integrado, cada paso en la fabricación de este insumo puede influir en las propiedades finales de la proteína y en el diseño del proceso de producción económicamente factible.(Grossmann *et al.,* 2020). Lo anterior incluye la adecuada selección de especies, así como condiciones de cultivo adecuadas. Se ha dado amplio uso a distintas especies de cianobacterias para estos fines teniendo como principales exponentes de estas tecnologías a *Nostoc sphaeroides* y *Arthrospira platensis*, análisis muestran altas acumulaciones de proteína de alta digestibilidad, con valores del 82% y 81% respectivamente además, los aminogramas indican una alta abundancia relativa de todos los aminoácidos esenciales, siendo el aspartato y glutamato los de mayor presencia (Hachicha *et al.,* 2022). Las capacidades de producción de proteína y compuestos únicos en estos microorganismos puede deberse a adaptaciones que en su mayor parte forman un amplio abanico de moléculas que entre otras cosas son una fuente virtualmente inagotable de productos alimenticios, biocombustibles y fármacos contra numerosas afecciones, microorganismos y virus (Carrasco-Reinado *et al.,* 2019; Deyab *et al.,* 2019; Grossmann *et al.,* 2020; Kanaga *et al.,* 2022).

La producción y demanda de azúcares el mercado mundial de la glucosa de maíz alcanzó un volumen de 3,5 millones de toneladas en 2016; si se dispusiese de la tecnología para extraer estos azúcares de las microalgas, aumentaría el valor neto de la biomasa obtenida en los diversos procesos y tecnologías productivas de microalgas (Carrasco-Reinado *et al.*, 2019). Así mismo, los biocombustibles que se obtiene a partir de la biomasa de microorganismos autótrofos son un área de investigación relativamente nueva. Durante los últimos años, se han estudiado extensamente a las cianobacterias para la producción de biocombustibles, enfatizando en la capacidad de producir lípidos y la rápida acumulación de biomasa (Sadvakasova *et al.*, 2021). Los lípidos de las cianobacterias son

ampliamente diversos en comparación con los lípidos de las algas y plantas superiores. El potencial fotosintético en el planeta, la variedad y versatilidad de lípidos de las cianobacterias y el potencial de producción masiva de éstas, captan poderosamente la atención de la investigación del campo bioenergético tiendo un gran potencial en la producción de biocombustibles. Por lo anterior, el enfoque del estudio consiste en evaluar la capacidad de producción de metabolitos primarios de las cepas de la Colección de Algas y Cianobacterias LAUN.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Obtención de la biomasa de cianobacterias LAUN

Las cepas se obtuvieron del cepario LAUN, de las accesiones 56 a la 114 correspondientes en su mayoría a los órdenes Synechococcales y Oscillatoriales, las cuales se activaron y masificaron en cajas de petri con los medios sólidos de cultivo con que se manejan en el cepario (marinas en BG11 marino y ASNIII, aguas continentales en BG11) para después transferirlas a crecimiento en los correspondientes medios líquidos (1L) con burbujeo con aire ambiental microfiltrado. Los cultivos se realizaron en sistema Bach en fotobiorreactor con temperatura 23°C +/- 2°C, fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad, intensidad lumínica de 300 µmol m^{-2} s^{-1}(Darwich *et al.,* 2017), en el cuarto de cultivo del Laboratorio de Cultivo de Algas de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2.2 Secado por Liofilización

El proceso de deshidratación por liofilización se realizó con el fin de garantizar la estabilidad de los metabolitos a evaluar y para facilitar la conservación, transporte y tratamiento del material para las pruebas. Se utilizó el liofilizador de marca LABCONCO de 4,5L de capacidad.

Caracterización del metabolismo primario

3.2.3 Cuantificación de proteínas

Como primera instancia se buscó calibrar y estandarizar los tiempos de lisis celular y extracción de proteína respecto a la biomasa, por lo tanto, se estableció un experimento con biomasa de *Arthrospira platensis,* previamente liofilizada, determinando que el tiempo óptimo de extracción está sobre las 2 horas de lisis y arrastre con buffer fosfato tal como se aprecia en la figura (Figura 3-1).

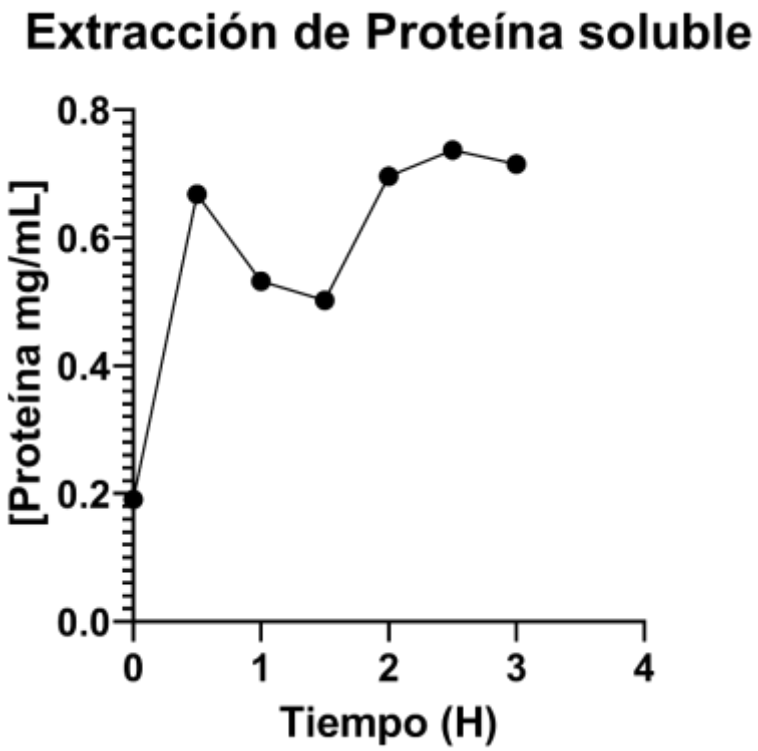


Figura 3-1: Calibración de los tiempos de extracción de proteína con buffer PO_4

La determinación de proteínas se realizó con cinco repeticiones con el método de Bradford (Bradford, 1976). Se pesó 0,01 g de biomasa liofilizada, en tubos eppendorf de 2,5 ml, posteriormente se adicionó 2 ml de buffer de fosfato de sodio [0,02 M; pH 6] (Benchikh *et al.,* 2020; Malgarejo *et al.,* 2010) y perlas de vidrio (para asegurar el rompimiento celular) y se dispuso el montaje en un shaker a 900RPM y en condiciones de oscuridad.

Se sometió la muestra a agitación en vórtex durante 5 min y posteriormente se precipitó mediante centrifugación a 6000 rpm 5 min, finalmente en un nuevo tubo de eppendorf se adicionó 50µL del sobrenadante del extracto, 150µL de buffer fosfato y 200µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad 2006), se homogenizó en vórtex por un minuto, posteriormente se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 595 nm.

La curva de calibración se realizó con albúmina siguiendo las concentraciones enunciadas en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Curva de calibración de proteínas solubles

Volumen del patrón de BSA (µL)	**Volumen del buffer PO_4^{-2} (µL)**	**Volumen del reactivo Bradford (µL)**	**Concentración del patrón (mg/mL)**
0	800	200	0,0000
2	798	200	0,0027
4	796	200	0,0053
6	794	200	0,0080
8	792	200	0,0106
10	790	200	0,0133

3.2.4 Cuantificación de carbohidratos

Para la cuantificación de carbohidratos totales solubles se siguió la metodología Fenol – Ácido Sulfúrico de Dubois *et al.*, (1956). Para la reacción colorimétrica se tomó 30µL de cada patrón en un eppendorf de 2mL al cual se le agrega 180µL de agua desionizada, posteriormente se agrega 200µL de una solución de fenol en agua desionizada 80%P/V. Finalmente se agregó 1000µL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó por 5min en vórtex y se dejó que la solución alcance la temperatura ambiente para medir en espectrofotómetro a 490nm.

Para la medición de las muestras, en un eppendorf 1.5mL se disponen 0.01g de biomasa seca y 0.04g de perlas de vidrio estériles y 1mL de ddH_2O, se somete a agitación en shaker a 900RPM por 60min a temperatura ambiente, con lo que se realiza la extracción de los carbohidratos solubles, posteriormente se centrifuga el material a 600RPM por 30min.

Para la medición, se toma 30µL de sobrenadante en un tubo nuevo y se agrega 180mL de dH2O, seguido de 200µL de una solución acuosa de Fenol 80% P/V y finalmente 1000µL de ácido sulfúrico concentrado, se agita por 5min en vórtex y se deja que la solución alcance la temperatura ambiente para medir en espectrofotómetro a 490nm.

Se realizó la curva de calibración con un patrón de 100mg/mL de glucosa anhídrida en H_2Odd estéril con el cual se fabricaron 5 soluciones patrón como se indica en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Curva de calibración de carbohidratos solubles

Volumen del patrón de glucosa (µL)	**Volumen del dH_2O (µL)**	**Volumen del reactivo [Fenol80%/H_2SO_4] (µL)**	**Concentración del patrón (mg/mL)**
0	210	200/1000	0,000
5	205	200/1000	0,004
10	200	200/1000	0,007
15	195	200/1000	0,011
20	190	200/1000	0,014
25	185	200/1000	0,018

3.2.5 Cuantificación de lípidos

Se realiza la extracción de lípidos por gravimetría, facilitando el arrastre de lípidos de la biomasa con la metodología Soxhelt, para esto, se pesó 100mg de biomasa seca y se empaquetó de forma tal que se evite la perdida de biomasa al estar en

contacto con el solvente, el cual consta de una solución Metanol:Cloroformo 2:1 (Volumen final: 300mL). El montaje Soxhelt se selló en sus juntas esmeriladas con una fina capa de grasa termorresistente para evitar fugas de solvente. Posteriormente se vertió la solución de Metanol:Cloroformo en el balón del montaje Soxhelt sin superar las ¾ partes del volumen total del balón, en este mimo sentido, se ubicó la muestra dentro de la cámara de extracción del montaje Soxhelt. Una vez ensamblado el montaje se ubican los flujos de refrigerante y el montaje completo sobre una plancha de calentamiento ajustada a 68°C. La extracción se estandarizó bajo 10h de exposición. Se recuperó el paquete con biomasa ya tratada en el extractor y se sometió a flujo de aire caliente en un desecador a 70°C durante 1h para su posterior pesaje en balanza analítica Sartorious TE214S

3.2.6 Cuantificación de pigmentos

Se siguió el mismo método de extracción de proteínas ya citado con el fin de extraer y estabilizar las ficobiliproteínas presentes en la biomasa y se cuantificó el extracto por espectrofotometría a 565, 620 y 650nm siguiendo la metodología de Bennett & Bogorad (1973), junto a los coeficientes de extinción propuestos por Bryant *et al.* (1979).

3.2.7 Análisis Estadístico

Para el procesamiento de los datos obtenidos se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad, posteriormente se aplicaron análisis de varianzas de una vía con un p= 0.01 (*) y un p= 0.001(**) para detectar diferencias significativas, y prueba de Tukey para detectar cual grupo presenta diferencia significativa con los demás. Lo anterior se realiza mediante análisis por el programa IBM SPSS Statistics, por otro lado, el procesamiento visual de los datos fue elaborado en la plataforma Graphpad Prims

3.3 Resultados

En la cuantificación de proteínas de las cepas LAUN, se encontró un mayor contenido de proteína en las cepas de origen marino (más de 4 veces) en comparación con las cepas de agua dulce. Encontrando diferencias altamente significativas en las cepas LAUN 31 (*Baaleninema sp.*), LAUN 33 (*Baaleninema sp.*), LAUN 37 (*Baaleninema sp.*), LAUN 38 (*Baaleninema sp.*), LAUN 41 (*Baaleninema sp.*), LAUN 71 (Synechococcales cyanobacterium) y LAUN 81 (Synechococcales cyanobacterium) con el resto del cepario de cianobacterias LAUN. Así mismo, se encontró que LAUN 81 (Synechococcales cyanobacterium) presenta diferencias significativas con las cepas de mejor rendimiento proteico ($p=0.001$), con rendimientos de 0.952mg de proteína soluble en 5mg de biomasa, suponiendo un porcentaje total de proteína soluble de 19.04% como se observa en la Figura 3-2.

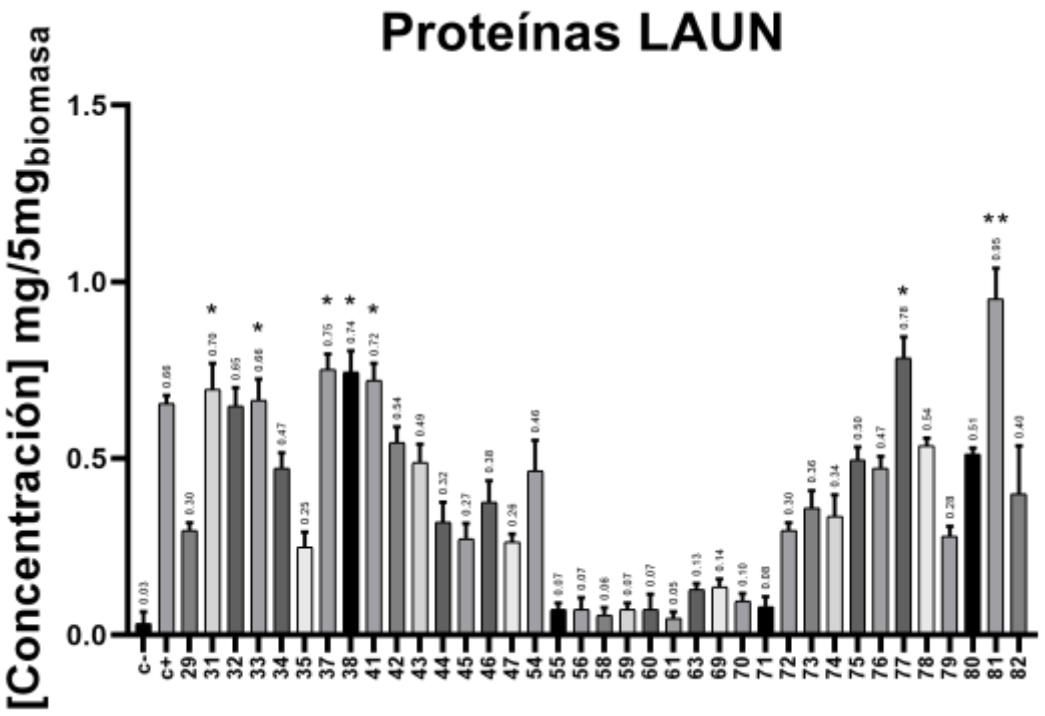


Figura 3-2: Acumulación de proteínas solubles de las cepas LAUN. *(p=0.01), **(p=0.001)

En la Figura 3-3 se observa la concentración total de ficobiliproteínas cuantificadas por el método descrito por Bennett & Bogorad (1973), se observan posibles interacciones del método Bradford con las ficobiliproteínas presentes en la muestra dadas las concentraciones de proteína total soluble de las cepas y el porcentaje elevado de ficobiliproteínas censadas por este método.

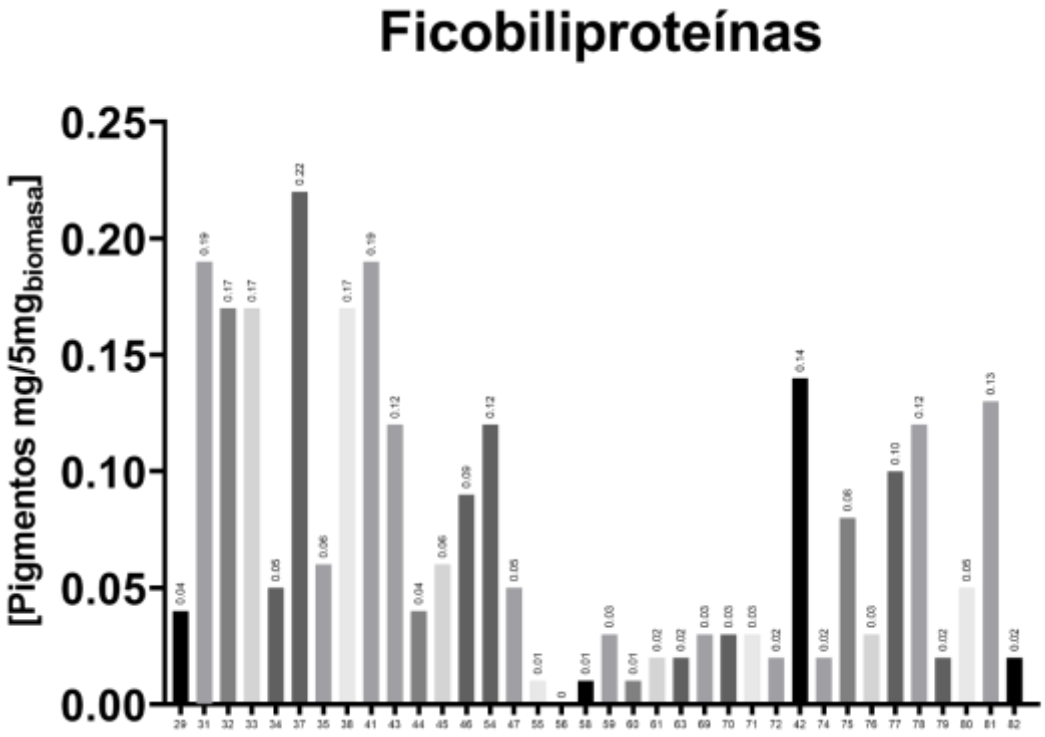


Figura 3-3. Acumulación de ficobiliproteínas totales de las cepas LAUN

Se observa la misma tendencia de los análisis de proteínas solubles totales de las cepas LAUN en relación con la acumulación de ficobiliproteínas, y se muestran las concentraciones de los tres pigmentos presentes del ficobilisoma, tal como se aprecia en la Figura 3-4.

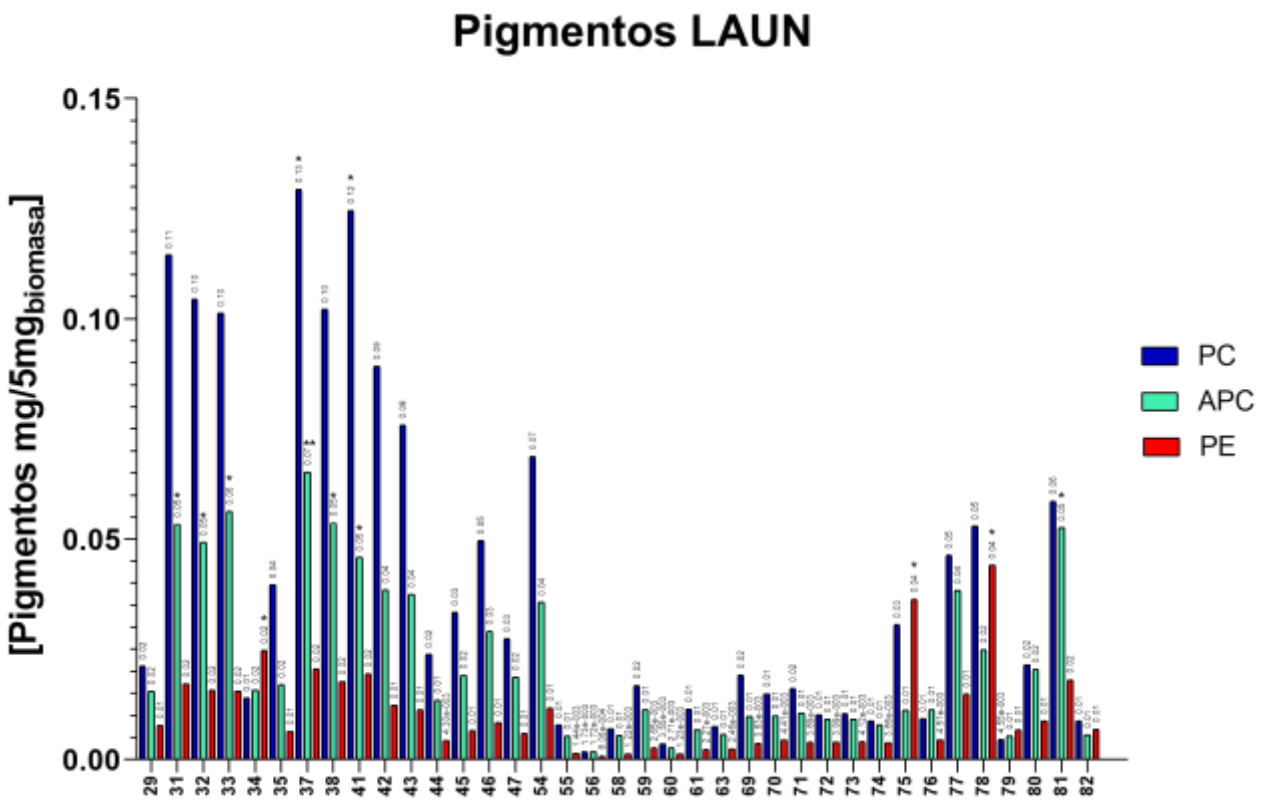


Figura 3-4 Concentración de ficobiliproteínas de las cepas LAUN. *(p=0.01), **(p=0.001)

Es notable una mayor acumulación de pigmentos en las cianobacterias de origen marino respecto a las cianobacterias de aguas continentales, así, las cianobacterias LAUN 37 (*Baaleninema sp.*) y LAUN 41 (*Baaleninema sp.*), presentan la mayor acumulación de ficocianina de todas las demás cianobacterias del cepario LAUN (p=0.01). Las cepas LAUN 31 (*Baaleninema sp.*), LAUN 32 (*Baaleninema sp.*), LAUN 33 (*Baaleninema sp.*), LAUN 37 (*Baaleninema sp.*), LAUN 38 (*Baaleninema sp.*), LAUN 41 (*Baaleninema sp.*) y LAUN 81 (Synechococcales cyanobacterium) presentaron la mayor acumulación de aloficocianina en el cepario (p=0.01), así mismo la cepa LAUN 37 (*Baaleninema sp.*) presento diferencias significativas (p=0.001) frente a las demás cepas LAUN de mayor producción de este pigmento. Finalmente, las cepas LAUN 34 (*Pleurocapsa sp*), LAUN 75 (Synechococcales cyanobacterium) y LAUN 78 (*Hyella sp.*) fueron las que presentaron diferencias significativas (p=0.01) para la acumulación de ficoeritrina en el cepario, sin embargo cabe resaltar que aunque

en proporción a su peso seco LAUN 78 (*Hyella sp.*) es la que acumula más este pigmento, la producción de ficocianina es mayor y por esto su pigmentación es aparentemente violeta siendo entonces LAUN 75 (Synechococcales cyanobacterium) la cianobacteria con la pigmentación roja aparentemente más limpia de todo el cepario.

En la Figura 3-5 se observa que la concentración de carbohidratos solubles en casi todas las cepas fue similar, indistintamente a la procedencia, teniendo que solo la cepa LAUN34 (*Pleurocapsa sp.*) presentó el más alto rendimiento de carbohidratos con 1.173mg de carbohidratos solubles por cada 10mg de biomasa y una diferencia altamente significativa sobre todas las demás cepas LAUN, acumulando hasta un 11,73% del peso seco en carbohidratos solubles.

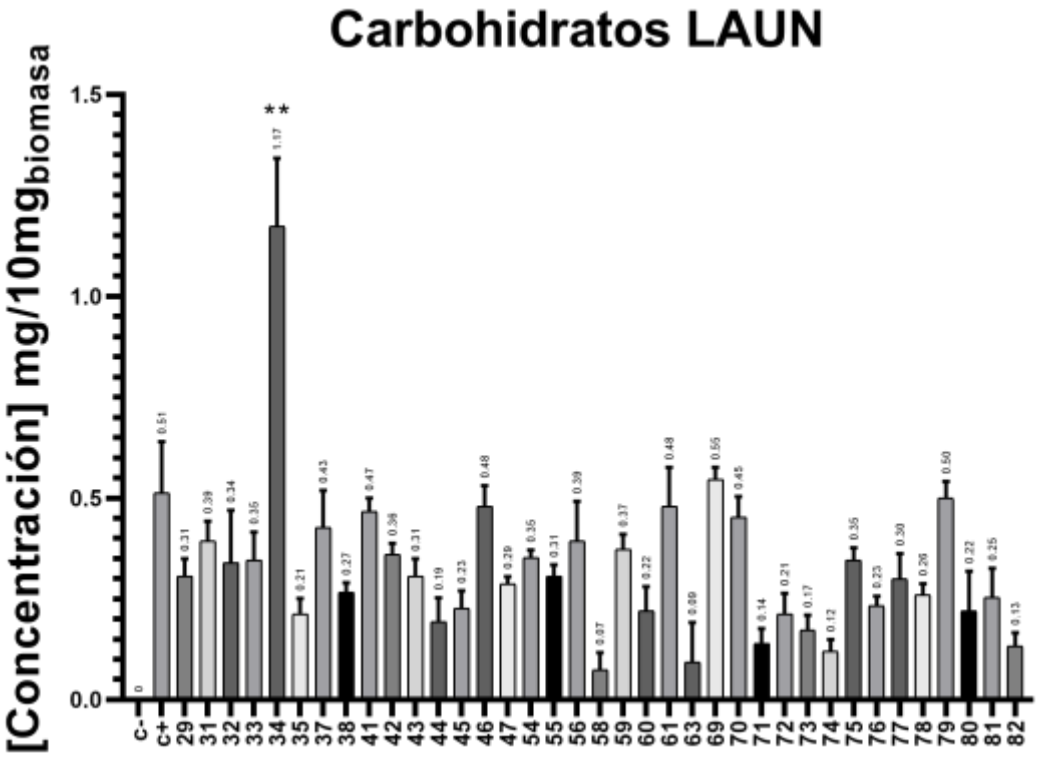


Figura 3-5. Acumulación de carbohidratos solubles de las cepas LAUN **(p=0.001)

Por último, la concentración de lípidos totales en las muestras evidenció una mayor acumulación en las cepas marinas como se observa en la Figura 3-6 , las cepas LAUN 29 (*Synechococcus sp*), LAUN 33 (*Baaleninema sp.*), LAUN 46 (*Baaleninema sp.*), LAUN 63 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN 74 (Synechococcales cyanobacterium) y LAUN 81 (Synechococcales cyanobacterium) fueron las que presentaron mayores rendimientos de lípidos totales (p=0.01) sobre las demás cepas de cianobacterias LAUN. Así mismo, la cepa LAUN 74 (Synechococcales cyanobacterium), presentó la mejor acumulación de lípidos (48.6mg/100mg) de todo el cepario y presentó diferencias altamente significativas frente a las cepas LAUN 46 (*Baaleninema sp.*) y LAUN 81 (Synechococcales cyanobacterium) de también alta producción de lípidos en el cepario LAUN.

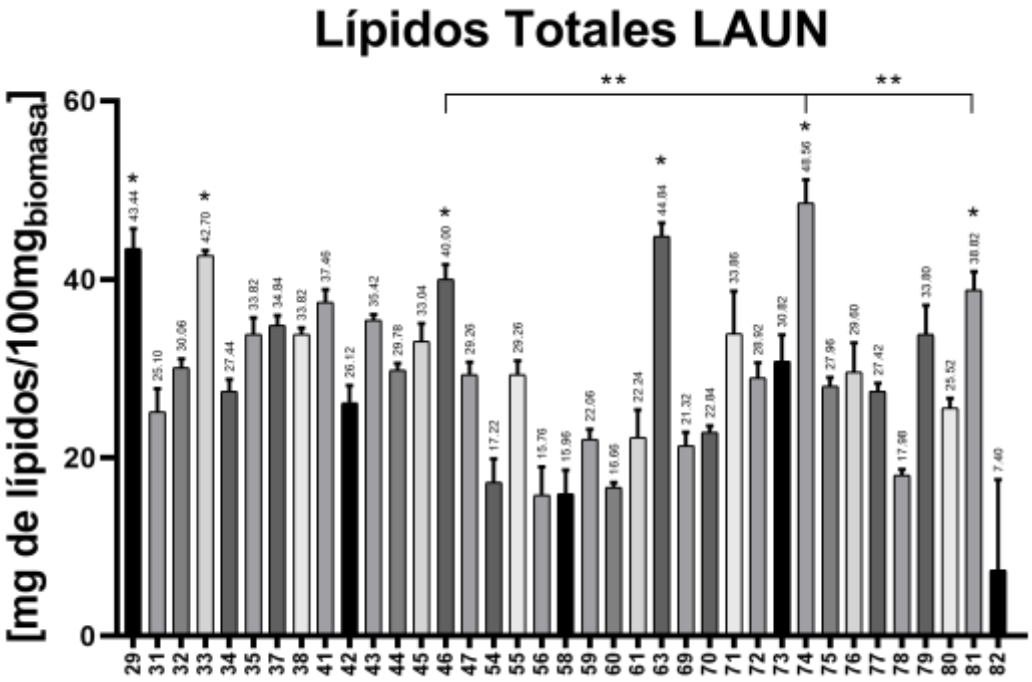


Figura 3-6. Lípidos totales de las cepas LAUN. *(p=0.01), **(p=0.001)

3.4 Discusión

El uso de cianobacterias como fuente rica en proteínas es del interés del sector científico e industrial desde mediados del siglo 20, ganando una considerable atención desde la década de los 50's, así mismo desde la década de los 70's como una fuente factible de energía renovable (Grossmann *et al.,* 2020). Estos microorganismos son considerados como una fuente rica en proteínas de alta digestibilidad con porcentajes de acumulación en peso seco que pueden llegar hasta 80% y digestibilidad en algunas especies de hasta 90%.(Hachicha *et al.,* 2022). En los análisis de proteína soluble practicados se encuentra una proporcionalidad coincidente con lo reportado por Hachicha *et al.* (2022), quienes fijan rendimientos de proteína en microalgas entre 6% y 80%. La cianobacteria LAUN81(Synechococcales cyanobacterium), alcanza rendimientos de proteína soluble de 19.04% siendo ésta la que presenta mayor acumulación de proteína soluble, sin embargo, no se acerca a los rendimientos reportados por Hachicha *et al.* (2022) por la cianobacteria *A. platensis* que alcanza acumulación de hasta 71% de proteína total respecto su peso seco, Niccolai *et al.* (2019), indica, no solo porcentajes de acumulación de proteína cercanos al 65% en biomasa seca de 20 cianobacterias distintas, sino también, una digestibilidad de la misma de hasta un 78% en *A. platensis*. En las cepas LAUN se observó una marcada tendencia hacia una mayor acumulación de proteínas solubles en cianobacterias marinas que en las de aguas continentales con diferencias en promedio de hasta $0.37mg/5mg_{biomasa}$, Sánchez-Bayo *et al.* (2020), indica que en *A. maxima* se presenta una acumulación de proteína de 93,4% cultivando la cianobacteria en medio marino enriquecido con el medio F/2 (Andersen, 2005), sin embargo, los autores también reportan que para las cianobacteria *A. maxima*, los porcentajes de proteína soluble se encuentran en el rango de 1% a 3% del peso seco de la biomasa, siendo consistente con lo encontrado con las cepas LAUN y de hecho, teniendo rendimientos promedio superiores (7.6%) según lo reportado por los autores. Por otro lado, LAUN61 (Synechococcales cyanobacterium) presentó la menor acumulación de proteína soluble con el 0.96% de su peso seco siendo muy inferior a lo que reportan diversos autores, sin embargo, cabe resaltar que, se

podría estar subestimando la acumulación total de proteína producida por cada cepa dado que en el método de extracción seleccionado se realiza una disrupción mecánica del material seco y extracción por exceso de solvente polar (Buffer fosfato) por lo cual, las proteínas no polares, proteínas con dominios transmembrana y las proteínas hidrofóbicas no se verían arrastradas por el solvente (Goldring, 2019). En este mismo sentido Du *et al.* (2020), compara tres metodologías para extracción de proteínas en biomasa vegetal y cianobacterias (Extracción en agua, medio alcalino y extracción subcrítica en agua) y sugiere que para cianobacterias las metodologías de lisis alcalina y agua subcrítica proporcionan mejores rendimientos que metodologías de arrastre de proteínas (hasta 68.8% en biomasa de *A. platensis*). En el método de extracción en agua los rendimientos son menores debido a que se busca generar un arrastre por difusión provocando un choque osmótico que se induce a través de la membrana celular y la pared celular, sin embargo, no es suficiente para permitir que las proteínas permeen estas dos barreras. Al contrastar las concentraciones de proteínas y ficobiliproteínas (pigmentos), se notó una acumulación alta de ficobiliproteínas en las cepas LAUN con relación a la cantidad de proteínas encontradas, estos pigmentos son de naturaleza proteica y por sí solos configuran una fracción de la proteína soluble presente, las muestras LAUN registran en algunos casos concentraciones de hasta 28% de pigmentos, Ji *et al.* (2023) y Prates *et al.* (2018), reportan rendimientos típicos de entre 0.4% hasta 13% de ficobiliproteínas en diferentes cianobacterias *como A. platensis, Phormidium sp., Anabaena sp., Nostoc sp., Spirulina sp.* y *Galdieria sp*., encontrando así que las cepas LAUN tienen más del doble de la concentración típica de ficobiliproteínas que en lo que se reporta en la literatura (Chaiklahan *et al.*, 2022; Cottas *et al.*, 2022; Ji *et al.*, 2023; Prates *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2022). Liu *et al.* (1999) y Rodriguez *et al.* (2016), reportan que en las estructuras aromáticas de los residuos aminoacídicos de tirosinas de las ficobiliproteínas cercanas a los puntos de anclaje de los cromóforos, configuran estructuras de resonancia cuyos rangos de absorción varían desde los 400nm hasta los 690nm (dependiendo del cromóforo que interactúe con los residuos aromáticos de las apoproteína), estas absorbancias se

superponen con la fluorescencia que emite el colorante azul brillante de Coomassie G 250 (colorante del reactivo de Bradford) al unirse a los grupos amino de los aminoácidos básicos en los enlaces peptídicos(Bradford, 1976), resultando en una interferencia de la señal emitida por el reactivo Coomassie G250, derivando en una subestimación de la cantidad de proteína que puede reportar la prueba. Por último, los mayores rendimientos de ficocianina se presentó en la cepa LAUN 37 (*Baaleninema sp*.) con 0.13 mg/5$mg_{biomasa}$, siendo ésta una cianobacteria de hábitos marinos del caribe colombiano y produciendo a escala de laboratorio cerca del doble de ficocianina que cianobacterias como *A. platensis* para la cual su uso esta generalizado industrialmente para la producción de biomasa y productos derivados como pigmentos (İlter *et al.,* 2018; Kannaujiya *et al.,* 2018), La cianobacteria LAUN78 (*Hyella sp.*) es la que posee mayor producción de ficoeritrina sin embargo, al tener rendimientos equiparables de ficocianina la coloración roja no es tan clara dado que alcanza tonalidades inclinadas hacia la gama del violeta, sin embargo la cepa LAUN 75 (Synechococcales cyanobacterium), de hábitos marinos del caribe Colombiano, genera tonalidades de rojo más puro dada su baja producción de ficocianina respecto a la ficoeritrina, la acumulación de ficoeritrina alcanzó los 0.0364mg/5$mg_{biomasa}$ lo cual es 900 veces superior a la producción reportada por Babu Balaraman *et al.* (2021), en la alga rodoficea *Porphyrium cruentium* (0.000041mg/5$mg_{biomasa}$), encontrando en la colección LAUN una cepa con un alto potencial para la producción industrial de ficoeritrina. Por otra parte, se debe evaluar para la industria de las ficoeritrinas si es mejor la utilización de una cepa con alta producción de este pigmento en asocio con la ficocianina como LAUN 78 (*Hyella sp.*) o sería mejor una menor producción, pero más pura por deficiencia de ficocianina como sucede con la cepa LAUN 75 (Synechococcales cyanobacterium).

La cepa LAUN 34 (*Pleurocapsa sp.*) presentó una producción de carbohidratos solubles de 1.173mg/10$mg_{biomasa}$ (11.73%), siendo esta la cepa con mayor concentración de carbohidratos de todo el cepario, casi triplicando la producción de la cianobacteria con la segunda mayor producción LAUN 29 (*Synechococcus*

sp.). María *et al.* (2018), reporta acumulación de carbohidratos totales de hasta 48% en reactores en configuración Batch con cianobacterias, así mismo Tsolcha *et al.* (2021), recuperó carbohidratos fermentables de la biomasa de *Leptolyngbya sp.* y sometiéndolos a fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, alcanzando rendimientos del 20.6% de azúcares totales y cerca del 55.2% en azúcares reductores por medio de hidrolisis ácida, se tiene que la cepa LAUN34 (*Pleurocapsa sp.*) generó la mitad de las concentraciones respecto a *Leptolyngbya sp*, solo en azucares solubles, sigue siendo una excelente alternativa para la producción de carbohidratos.

Rueda *et al.* (2020), demostró acumulación de hasta 69% en carbohidratos con *Synechococcus sp* y *Synechocystis sp* para la producción de polímeros a partir de aguas residuales, los autores sugieren metodologías de hidrolisis ácida para aumentar los rendimientos de carbohidratos, sin embargo, el método de extracción no refleja la realidad de las cepas pues al cuantificar solo la fracción soluble, se deja por fuera una amplia porción de carbohidratos retenidos entre restos celulares, pared y membrana; tal como lo indica Tan *et al.* (2020), Du *et al.* (2020), y Sánchez-Bayo *et al.* (2020), las técnicas de extracción de metabolitos requieren no solo de solventes con fuertes interacciones frente a sus solutos, sino de efectivos procesos de disrupción celular, ya que la biomasa de las cianobacterias ofrece resistentes propiedades mecánicas que dificultan el arrastre de moléculas, lo que deriva en una baja tasa de cuantificación de los mismos siendo indiferente la técnica de cuantificación utilizada. González-Balderas *et al.* (2020), sugiere realizar un pretratamiento de la biomasa con ultrasonido y altas temperaturas (100°C) durante una hora, y Carrasco-Reinado *et al.* (2019), sugieren realizar hidrólisis ácida con HCl al 2% en ultrasonicador a 0°C. Sin embargo, como se observó en el capítulo 2, las especies analizadas también se caracterizan morfológicamente por ser muy delgadas y pequeñas, sin grandes producciones de carbohidratos extracelulares o mucilago, una posible explicación adicional para los valores bajos de carbohidratos encontrados en las cepas LAUN.

Con respecto a todas las cepas LAUN el mayor rendimiento se obtuvo en la cepa LAUN74 (Synechococcales cyanobacterium) con una producción de 40.5% de lípidos del peso total de la biomasa, valor consistente con lo reportado por Shahid *et al.* (2021), teniendo acumulación de hasta 49% de lípidos en peso seco de la cianobacteria halófita *Plectonema terebrans*. La cianobacteria LAUN74 se encuentra cerca al límite reportado por la literatura para la acumulación de lípidos por una microalga (50%del peso seco)(Hachicha *et al.*, 2022). Según lo reportado por Kanaga *et al.* (2022), quienes establecen un protocolo de extracción de metanol:cloroformo 2:1 para la extracción de lípidos totales en *Chlorella vulgaris* para la producción de biodiesel, se obtienen rendimientos de 1.02mg/100mg$_{biomasa}$ para la posterior transesterificación de los lípidos extraídos, siento cuarenta y siete veces menor respecto al rendimiento obtenido con LAUN 74 (Synechococcales cyanobacterium) por el mismo método de extracción. En el mismo sentido todas las cepas LAUN en acumulación de lípidos, están un orden de magnitud por encima de lo reportado por Kanaga *et al.* (2022) en *Chlorella vulgaris,* con rendimientos del 1% del peso seco en recuperación de lípidos. Serrano-Bermúdez *et al.* (2020) utilizan a *Scenedesmus ovalternus, Parachlorella kessleri, Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp*. en la obtención de lípidos para la generación de biodiesel teniendo rendimientos de entre 13.4% y 18.9% de lípidos totales en peso seco de biomasa, teniendo que todas las cianobacterias del cepario LAUN a excepción de LAUN54, LAUN56, LAUN58, LAUN59, LAUN60, LAUN61, LAUN69, LAUN78 y LAUN82, superan en promedio un 10% la producción de lípidos de las clorofíceas reportadas por los autores, por lo que se encuentra que las cepas LAUN pueden ser una mejor fuente de lípidos que las clorofíceas más utilizadas para dicho fin.

Sadvakasova *et al.* (2021), señala rendimientos de lípidos de la cepa *Synechocystis sp.* PCC6803 en 12.5% y Hossain *et al.* (2020), reporta la acumulación de lípidos por múltiples cianobacterias: *Oscillatoria sp*. (31.9%), *Synechococcus sp*. (30.6%), *Croococcidiopsis sp.* (22.7%), *Leptolyngbya sp.* (21.15%), *Limnothrix sp*. (20.73%), resaltando que porcentualmente las cianobacterias LAUN de más altos rendimientos lipídicos (LAUN 29

(*Synechococcus sp.*), LAUN 33 (*Baaleninema sp.*), LAUN 46 (*Baaleninema sp*.), LAUN 63 (Synechococcales cyanobacterium) y LAUN 74 (Synechococcales cyanobacterium)) son superiores con un promedio de acumulación de lípidos de 36.6% y se proponen como candidatas para el cultivo masivo y obtención de lípidos transesterificables para procesos de producción de biocombustibles.

3.5 Conclusiones

Las especies del cepario LAUN representan un amplio e interesante catálogo de posibles candidatos a masificación y explotación de metabolitos primarios tales como proteínas solubles de 0.952mg en la cepa LAUN 81. Cepas aplicables a sectores nutraceúticos e industriales por la capacidad pigmentaria como LAUN 37 (*Baaleninema sp*.) con acumulación de ficocianina de 0.13mg/5mg$_{biomasa}$ y en la cepa LAUN 75 (Synechococcales cyanobacterium) con una acumulación de ficoeritrina de 0.036mg/5mg$_{biomasa}$, dichos pigmentos tienen aplicabilidades industriales desde tinción de textiles hasta farmacéuticas. Así mismo, la alta producción de carbohidratos solubles por parte de la cepa LAUN 34 (*Pleurocapsa sp.*) con una acumulación de 1.173mg/10mg$_{biomasa}$ representa una interesante fuente energética ya sea para producción de alcoholes o polímeros para industrias energéticas o como una alternativa nutraceútica animal y humana. Finalmente, la acumulación de lípidos por parte de la cepa LAUN 74 (Synechococcales cyanobacterium) con una acumulación de 48.6mg/100mg$_{biomasa}$, representa una alternativa posiblemente sustentable para la producción de biocombustibles a bajos costos de producción además de ofrecer servicios ecosistémicos de remoción de contaminantes en el proceso de producción de biomasa. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el éxito en la obtención de las diversas moléculas de potencial interés va de la mano de técnicas efectivas de extracción de dichos metabolitos, generando la mayor disrupción celular posible en tiempos reducidos y limitando las condiciones redox inducibles en dichos procesos extractivos, de esta forma se optimizan los rendimientos en la obtención de los

metabolitos y se reducen los riesgos de reacciones desfavorables sobre los mismos.

3.6 Bibliografía

Andersen, R. A. (2005). Algal Culturing Techniques. In *Elsevier* (Vol. 1).

Babu Balaraman, H., Sivasubramanian, A., & Kumar Rathnasamy, S. (2021). Sustainable valorization of meat processing wastewater with synergetic eutectic mixture based purification of R-Phycoerythrin from porphyrium cruentium. *Bioresource Technology*, *336*(May), 125357. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125357

Benchikh, Y., Filali, A., & Rebai, S. (2020). Modeling and optimizing the phycocyanins extraction from Arthrospira platensis (Spirulina) algae and preliminary supplementation assays in soft beverage as natural colorants and antioxidants. *Journal of Food Processing and Preservation*, 0–2. https://doi.org/10.1111/jfpp.15170

Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, *58*(2), 419–435. https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Crop Journal*, *72*, 248–254. https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003

Bryant, D. A., Guglielmi, G., de Marsac, N. T., Castets, A. M., & Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, *123*(2), 113–127. https://doi.org/10.1007/BF00446810

Carrasco-Reinado, R., Escobar, A., Carrera, C., Guarnizo, P., Vallejo, R. A., & Fernández-Acero, F. J. (2019). Valorization of microalgae biomass as a potential source of high-value sugars and polyalcohols. *Lwt - Food Science and Technology*, *114*(January 2019), 108385. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108385

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Srinorasing, T., Attasat, S., Nopharatana, A., &

Bunnag, B. (2022). Enhanced biomass and phycocyanin production of Arthrospira (Spirulina) platensis by a cultivation management strategy: Light intensity and cell concentration. *Bioresource Technology*, *343*(September 2021), 126077. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126077

Cottas, A. G., Teixeira, T. A., Cunha, W. R., Ribeiro, E. J., & de Souza Ferreira, J. (2022). Effect of glucose and sodium nitrate on the cultivation of Nostoc sp. PCC 7423 and production of phycobiliproteins. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *39*(1), 1–9. https://doi.org/10.1007/s43153-021-00186-3

Darwich, M., Peña, E., Montenegro, L., & Benitez, N. (2017). *Evaluación del consorcio natural alga(Parachlorella kessleri)(CHLOROPHYCEAE)- bacteria en depuración de aguas residuales sintéticas*. Universidad del Valle.

Deyab, M., Mofeed, J., El-Bilawy, E., & Ward, F. (2019). Antiviral activity of five filamentous cyanobacteria against coxsackievirus B3 and rotavirus. *Archives of Microbiology*. https://doi.org/10.1007/s00203-019-01734-9

Du, L., Arauzo, P. J., Meza Zavala, M. F., Cao, Z., Olszewski, M. P., & Kruse, A. (2020). Towards the properties of different biomass-derived proteins via various extraction methods. *Molecules*, *25*(3). https://doi.org/10.3390/molecules25030488

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 7. https://doi.org/10.1038/168167a0

Goldring, J. P. D. (2019). Measuring protein concentration with absorbance, lowry, bradford coomassie blue, or the smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1855, pp. 31–39). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_3

González-Balderas, R. M., Velásquez-Orta, S. B., Valdez-Vazquez, I., & Orta Ledesma, M. T. (2020). Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae Desmodesmus sp. by using

ultrasound or ozone. *Ultrasonics Sonochemistry*, *62*, 104852. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104852

Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2020). Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein-based technofunctional food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(17), 2961–2989. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1672137

Hachicha, R., Elleuch, F., Hlima, H. Ben, Dubessay, P., de Baynast, H., Delattre, C., Pierre, G., Hachicha, R., Abdelkafi, S., Michaud, P., & Fendri, I. (2022). Biomolecules from Microalgae and Cyanobacteria: Applications and Market Survey. *Applied Sciences (Switzerland)*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/app12041924

Hossain, F., Ratnayake, R. R., Mahbub, S., Kumara, K. L. W., & Magana-arachchi, D. N. (2020). Saudi Journal of Biological Sciences Identification and culturing of cyanobacteria isolated from freshwater bodies of Sri Lanka for biodiesel production. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(6), 1514–1520. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.024

İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, *70*(April), 78–88. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007

Ji, L., Qiu, S., Wang, Z., Zhao, C., Tang, B., Gao, Z., & Fan, J. (2023). Phycobiliproteins from algae: Current updates in sustainable production and applications in food and health. *Food Research International*, *167*(March), 112737. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112737

Kanaga, S., Silambarasan, T., Malini, E., Mangayarkarasi, S., & Dhandapani, R. (2022). Optimization of biomass production from Chlorella vulgaris by response surface methodology and study of the fatty acid profile for biodiesel production: A green approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*,

45(October), 102505. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102505

Kannaujiya, V. K., Kumar, D., Pathak, J., & Sinha, R. P. (2018). Phycobiliproteins and Their Commercial Significance. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00010-6

Lin, P. C., Zhang, F., & Pakrasi, H. B. (2020). Enhanced production of sucrose in the fast-growing cyanobacterium Synechococcus elongatus UTEX 2973. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-57319-5

Liu, J. Y., Jiang, T., Zhang, J. P., & Liang, D. C. (1999). Crystal structure of allophycocyanin from red algae Porphyra yezoensis at 2.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(24), 16945–16952. https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16945

Malgarejo, L., Romero, M., Hernandez, S., Barrera, J., Solarte, E., Pérez, V., Rojas, A., Cruz, M., Moreno, L., Crespo, S., & Pérez, W. (2010). *Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia 1*.

María, D., Fradinho, J. C., Uggetti, E., García, J., Oehmen, A., & Reis, M. A. M. (2018). Polymer accumulation in mixed cyanobacterial cultures selected under the feast and famine strategy. *Algal Research*, *33*(January), 99–108. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.027

Niccolai, A., Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, *42*(April). https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617

Prates, D. da F., Radmann, E. M., Duarte, J. H., Morais, M. G. de, & Costa, J. A. V. (2018). Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology*, *256*(November 2017), 38–43. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122

Rodriguez, E. A., Tran, G. N., Gross, L. A., Crisp, J. L., Shu, X., Lin, J. Y., & Tsien, R. Y. (2016). A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein. *Nature Methods*, *13*(9), 763–769. https://doi.org/10.1038/nmeth.3935

Rueda, E., García-galán, M. J., Díez-montero, R., Vila, J., Grifoll, M., & García, J. (2020). Bioresource Technology Polyhydroxybutyrate and glycogen production in photobioreactors inoculated with wastewater borne cyanobacteria monocultures. *Bioresource Technology*, *295*(September 2019), 122233. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122233

Sadvakasova, A. K., Kossalbayev, B. D., Zayadan, B. K., & Kirbayeva, D. K. (2021). Potential of cyanobacteria in the conversion of wastewater to biofuels. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *37*(8), 1–22. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03107-1

Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2020). Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria: Effect of Operating Conditions on Growth and Biomass Composition. *Molecules*, *25*(12), 1–17. https://doi.org/10.3390/molecules25122834

Serrano-Bermúdez, L. M., Montenegro-ruíz, L. C., & Godoy-silva, R. D. (2020). Bioresource Technology Reports Effect of CO 2 , aeration , irradiance , and photoperiod on biomass and lipid accumulation in a microalga autotrophically cultured and selected from four Colombian-native strains. *Bioresource Technology Reports*, *12*(August), 100578. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100578

Shahid, A., Malik, S., Liu, C., Ghulam, S., & Aamer, M. (2021). Journal of Water Process Engineering Characterization of a newly isolated cyanobacterium Plectonema terebrans for biotransformation of the wastewater-derived nutrients to biofuel and high-value bioproducts. *Journal of Water Process Engineering*, *39*(September 2020), 101702. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101702

Tan, J. Sen, Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, *11*(1), 116–129. https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626

Tsolcha, O. N., Patrinou, V., Economou, C. N., Dourou, M., Aggelis, G., & Tekerlekopoulou, A. G. (2021). *Utilization of Biomass Derived from Cyanobacteria-Based Agro-Industrial Wastewater Treatment and Raisin Residue Extract for Bioethanol Production*.

Villalta-romero, F., Murillo-vega, F., & Martínez-gu-, B. (2019). *Microalgal biotechnology in Costa Rica : Business opportunities to the national productive sector Biotecnología microalgal en Costa Rica : Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional*. *32*, 85–93.

Zhu, B., Wei, D., & Pohnert, G. (2022). The thermoacidophilic red alga Galdieria sulphuraria is a highly efficient cell factory for ammonium recovery from ultrahigh-NH4+ industrial effluent with co-production of high-protein biomass by photo-fermentation. *Chemical Engineering Journal*, *438*(February), 135598. https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135598

4. Capítulo 4: Capacidad de remoción de contaminantes en aguas residuales sintéticas por parte de Cianobacterias de la colección LAUN

4.1 Introducción

La contaminación del agua es una consecuencia inherente al funcionamiento y desarrollo de las sociedades (Ponte *et al.*, 2022). Las aguas residuales, domésticas y agrícolas se caracterizan por altas cargas de materia orgánica, nitrógeno amoniacal y fósforo. Éstos constituyen un factor crítico en problemáticas ambientales, en los que son destacables la erosión del suelo, contaminación atmosférica producto de la volatilización del amoníaco, sulfuro de hidrógeno y la eutrofización de cuerpos de agua (Mousavi *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). En la actualidad, las aguas residuales se suelen someter a procesos oxidativos en lagunas, posteriormente son tratadas en lagunas anaeróbicas y como etapa final lagunas aérobicas facultativas o reactores de película con lecho móvil (Wang *et al.*, 2020), en donde las microalgas son las protagonistas, no solo generando el más alto consumo de CO_2 en la columna de agua, sino que también brindan una alternativa segura y rentable a la aireación mecánica (Z. Chen *et al.*, 2020), dada su capacidad para utilizar metabólicamente dichos nutrientes inorgánicos y orgánicos, siendo esta capacidad aplicable al tratamiento de aguas residuales con la generación de biomasa y múltiples metabolitos de interés industrial y comercial (El-Sheekh *et al.*, 2022).

La biorremediación con tecnologías basadas microalgas pueden contribuir a la solución de esta problemática, estos procesos se han centrado en la utilización de la diversidad genética y metabólica que caracteriza a estos microorganismos para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales. Estos procesos de

biodegradación por parte de microalgas en biorreactores han mostrado resultados prometedores para el tratamiento de aguas residuales proyectándolos a la implementación en plantas de tratamiento como lo muestra Hena *et al.* (2015) y Su *et al.* (2011), con remociones de hasta el 98% y 99,1% respectivamente. Mustafá *et al.* (2012), en tratamiento de lixiviados en rellenos sanitarios encontró remociones de 91%, Kumar & Goyal (2008) y Rengifo *et al.* (2012), en tratamiento de metales pesados, con remociones de Cr(IV) 86,16% y Pb(II) 87% respectivamente.

Las microalgas y cianobacterias suelen encontrarse en comportamientos poblacionales atípicos en ambientes eutróficos, éstas, presentan altas tasas de remoción y/o asimilación de material orgánico, prestando una importante labor ecológica en la purificación y reutilización del agua dentro de los diferentes ecosistemas (Watanabe *et al.,* 2005; de Bashan & Bashan, 2003; de-Bashan *et al.,* 2008; *Imase et al.,* 2008; Giraldo, 2012). Las microorganiasmos demuestran una notable capacidad de absorber nitrógeno y fósforo inorgánicos de forma eficiente, esto en asocio de microorganismos heterotróficos, encargados de degradar y mineralizar compuestos orgánicos de mayor complejidad (Nur & Buma, 2019; Wang *et al.*, 2020); por lo tanto, el uso de la acción conjunta de ambos microorganismos resulta ser útil para tratar aguas residuales con alto contenido de nitrógeno y fósforo que usando estos por separado. En los últimos años, estos tratamientos se han propuesto como métodos eficaces, reportándose variedad de consorcios basados en microalgas, que incluyen microalgas-bacterias, algas-hongos e incluso sistemas simbióticos de múltiples bacterias y algas (Wang *et al.*, 2020).

Se buscó establecer biotratamientos con microalgas tradicionales *Parachlorella kessleri* y *Desmodesmus armatus*. y contrastarlos con Cianobacterias colombianas del orden Synechoccocales, provenientes de la Colección LAUN. Las pruebas realizadas se efectuaron a escala de laboratorio con aguas residuales sintéticas, en donde se seleccionó la cianobacteria de mejor rendimiento en la remoción de nitratos, fosfatos y materia orgánica en términos de DQO y $DBO5_5$.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Todos los microorganismos utilizados: las clorofíceas LAUN83 (*Parachlorella kessleri)* y LAUN84 (*Desmodesmus armatus*), y las cianobacterias LAUN54 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN55 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN56 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN57 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN58 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN59 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN60 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN61 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN63 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN69 (*Leptolyngbya sp.*), LAUN70 (*Leptolyngbya sp.*) y LAUN71 (Synechococcales cyanobacterium), fueron suministrados por la Colección de Algas y Cianobacterias LAUN, de la Universidad Nacional de Colombia, donde las dos primeras cepas corresponden a los órdenes Chlorellales y Sphaeropleales respectivamente adaptadas y en crecimiento en medio de cultivo liquido BBM, y las cianobacterias, del orden Synechoccocales en crecimiento en medio de cultivo liquido BG11 (Tabla 4-1).

Tabla 4-1: Cepas LAUN utilizadas para el tratamiento de aguas residuales sintéticas

Código	Identificación final (basado en filogenia)	Medio de Cultivo
LAUN 55	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 56	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 57	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 58	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 59	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 60	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 61	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 63	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**
LAUN 69	*Leptolyngbya* sp.	**BG11**
LAUN 70	*Leptolyngbya* sp.	**BG11**
LAUN 71	Synechococcales cyanobacterium	**BG11**

LAUN 83	*Parachlorella kessleri*	**BBM**
LAUN 84	*Desmodesmus armatus*	**BBM**

4.2.2 SÍNTESIS DE SUSTRATOS DE CRECIMIENTO

Se diseñó un medio de agua residual sintética reajustando las preparaciones propuestas por Githinji *et al.* (2011), buscando alcanzar cargas orgánicas alrededor de 450mg O_2/L similares a las aguas residuales de producción pecuaria, desarrollando la siguiente formulación (Tabla 4-2):

Tabla 4-2: Composición del agua residual sintética (Medio Basal Agua Residual Sintética)

Componente	**Concentración mg/L**
Macronutrientes	
Peptona	150
Glucosa	150
Almidón	150
$NaHCO_3$	300
$NaNO_3$	234
KH_2CO_3	17.5
$CaCl_2$	5
$MgSO_4 . 7H_2O$	19,5
Micronutrientes	
$FeSO_4 . 7H_2O$	2,49
NaCl	0,25
$MnSO_4 . H_2O$	0,189
$CuSO_4$	0,25
$CoCl_2$. 6H2O	0,41
$NaMoO_4 . 2H_2O$	1,26
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,44

4.2.3 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Las condiciones de iluminación fue a 100µmol$_{fotones}$/m^2/s con luces Led blancas y fotoperiodo 12/12H a una temperatura constante de 25°C.

Los cultivos se realizaron en botellas de 300mL, con 200mL medio de cultivo agua residual sintética estéril e inoculo en una proporción 9/1 respectivamente, se realizaron 5 repeticiones. Se suministró burbujeo con aire ambiental ultrafiltrado y una duración del cultivo de 4 días.

El control negativo se trató del agua residual sintética sin inoculo, esto para evaluar las interacciones espontaneas de los parámetros a evaluar y como controles positivos se utilizaron las cepas LAUN83 (*P. kesleri*) y LAUN84 (*D. armatus*) dada su capacidad demostrada de remoción de contaminantes en aguas residuales.

4.2.4 MEDICIÓN DE PARÁMETROS

La cuantificación de nitratos, fosfatos, DQO y DBO_5 se siguen conforme a lo propuesto al Standar Metods, haciendo uso de los kits colorimétricos de la casa Hanna Instruments con códigos HI93728-01 para ion Nitratos, HI93717-01, para ion fosfato, HI93754C-25 para medición de DQO de rango alto (0-1500mg/L O_2), todas las mediciones efectuadas con un fotómetro Hanna 83314 y, por último, la medición de DBO_5 se realizó con el equipo de medición respirométrica Oxitop i-IS-6 ECOSPHERE.

4.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el procesamiento de los datos obtenidos se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad, posteriormente se aplicaron análisis de varianzas de una vía para detectar diferencias significativas y prueba de Tukey para detectar diferencias entre medias. Se utilizó el programa IBM SPSS

Statistics, por otro lado, el procesamient visual de los datos fue elaborado en la plataforma Graphpad Prims

4.3 Resultados

En las últimas décadas, al hablar en términos de remoción de contaminantes eutrofizantes en aguas residuales, es inevitable aludir a los tratamientos con microalgas dada su alta capacidad de biotransformación de nutrientes como nitrógeno, carbono y fósforo (C. Y. Chen *et al.*, 2020; Sepehri *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020), y como consecuencia, los atractivos rendimientos de biomasa por m^3 que éstas pueden llegar a presentar (Nur & Buma, 2019; Park *et al.*, 2017). A continuación, presentamos la actividad de biotransformación por parte de las cianobacterias LAUN pertenecientes al orden Synechoccocales, presentó los siguientes resultados.

4.3.1 Nitratos

Los resultados de remoción del ion nitrato demostró que en el agua residual sintética LAUN83 (*P. kessleri.*), LAUN84 (*D. armatus,*) *y* LAUN70 (*Leptolyngbya sp*), presentan valores de remoción significativos (p=0.01) y porcentajes de remoción de 96.67%, 95% y 95.83% respectivamente con relación a las cepas de cianobacterias LAUN54 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN55 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN56 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN57 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN58 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN59 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN60 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN61 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN63 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN69 (*Leptolyngbya sp*) y LAUN71 (Synechococcales cyanobacterium) y el control negativo$_{final}$ (Figura 4-1) las cuales presentaron porcentajes de remoción del ion nitrato de 88.33%, 89.17%, 87.50%, 90.83%, 89.17%, 90.83%, 86.67%, 88.33%, 88.33%, 78.33% y 77.50% respectivamente. Así mismo, todas las cepas de cianobacterias, los dos

controles positivos y el control negativo$_{final}$ presentan diferencias significativas (p=0.01) respecto al control necativo$_{inicial}$.

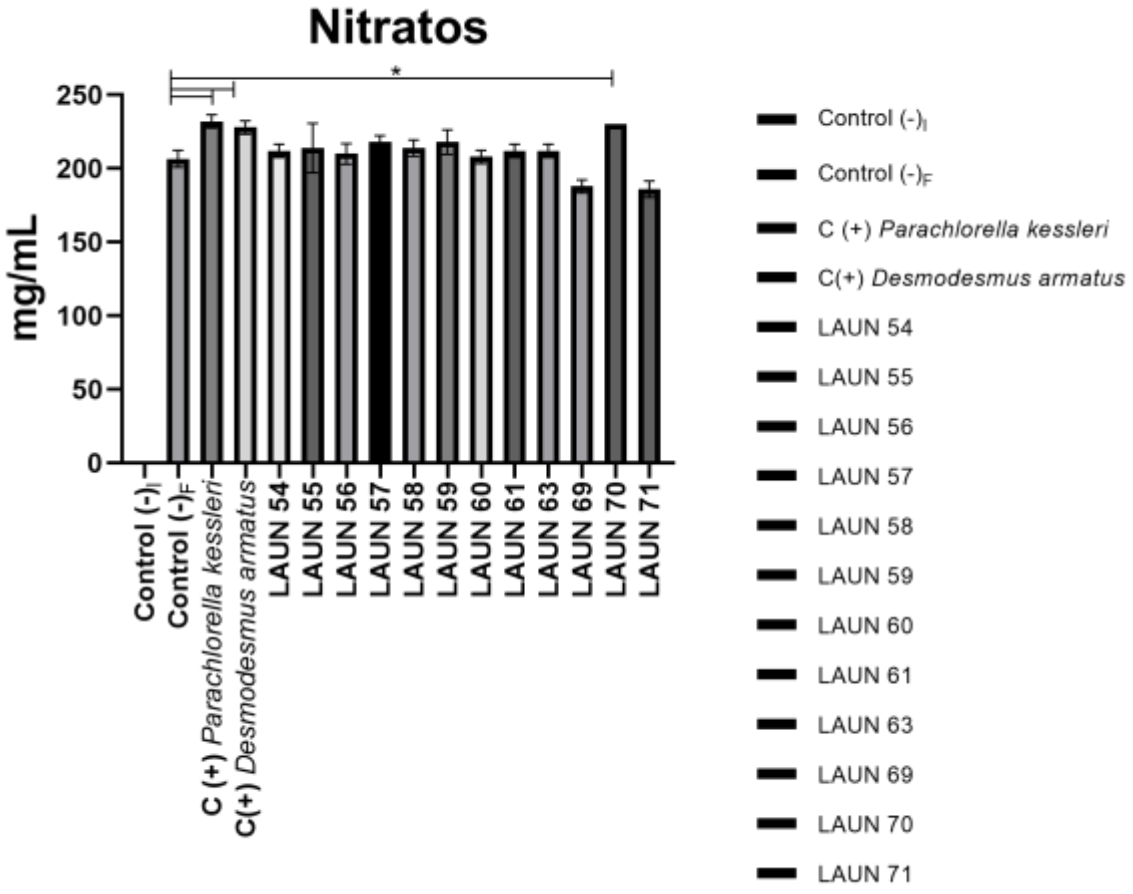


Figura 4-1: Remoción del ion nitrato por parte de las cepas de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01

4.3.2 Fosfatos

No se presentó remoción del ión fosfato por el control negativo. Las cepas LAUN54 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN56 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN58 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN59 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN60(Synechococcales cyanobacterium), LAUN61 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN63 (Synechococcales cyanobacterium) y LAUN71 (Synechococcales cyanobacterium) alcanzaron los

mayores valores de remoción 99%, 99%, 100%, 95%, 97%, 98% y 98%, respectivamente, presentando diferencias altamente significativas (p=0.01) con los controles positivos *D. armatus* (78%) y *P. kessleri* (67%). LAUN 55 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN 57 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN 69 (*Leptolyngbya sp*) y LAUN 70 (*Leptolyngbya sp*) no presentaron diferencias con los controles (Figura 4-2).

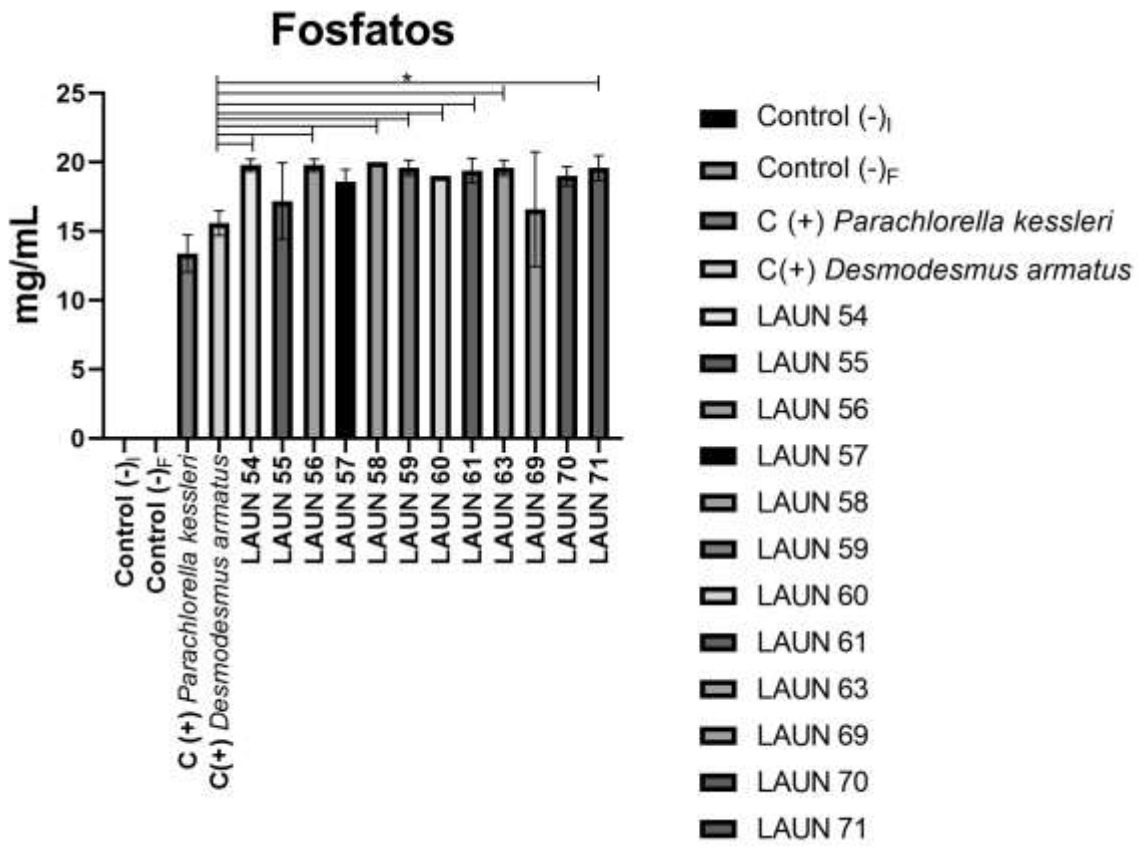


Figura 4-2: Remoción del ion fosfato por parte de las cepas de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01

4.3.3 DQO

En la reducción de la DQO en el medio de cultivo luego de 4 días de digestión, se encontró que solo la cepa LAUN71 (Synechococcales cyanobacterium) presentó remoción significativamente mayor (p=0.01) en comparación con las demás cepas y los controles con porcentaje de remoción de la DQO del 85.4% (Figura 4-3). Las

cepas de cianobacterias LAUN54 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN55 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN56 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN57 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN58 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN59 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN60 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN61 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN63 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN69 (*Leptolyngbya sp*) y LAUN70 (*Leptolyngbya sp*) presentaron porcentajes de remoción del ion fosfato de 48.13%, 63.49%, 59.89%, 42.84%, 50.71%, 34.25%, 59.59%, 63.61%, 38.77%, 65.05% y 49.48% respectivamente, siendo valores de remoción de la DQO similares y en algunos casos mayores a los que presentan los controles positivos de *P. kessleri* (35.23%)y *D. armatus* (50.63%).

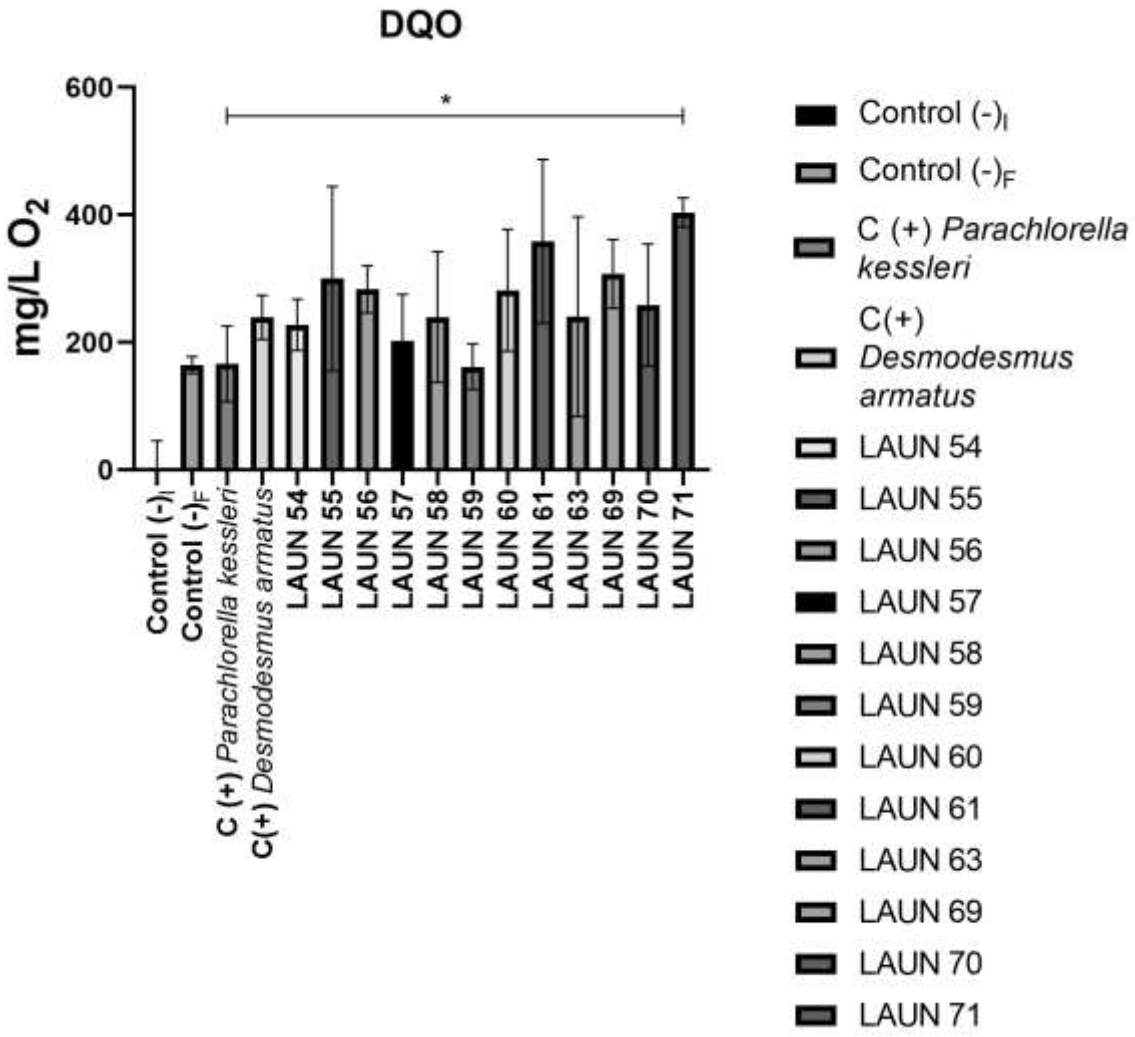


Figura 4-3: Reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) por parte de las de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01

4.3.4 DBO_5

Por último, se observó una importante reducción de la actividad microbiológica en los medios de cultivo por las doce cianobacterias mostrando diferencias altamente significativas (p=0.01) con los controles positivos de *P.kesslery* y *D. armatus*, en promedio los porcentajes de remoción de materia orgánica biológicamente oxidable fue de 94.5% por parte de las cianobacterias, en comparación con porcentajes de remoción de 57.1% y 51.1% de los controles positivos *P.kesslery* y *D. armatus* respectivamente, indicando una baja

disponibilidad de compuestos oxidables por medios biológicos (DBO_5), en promedio 37% menos en cianobacterias que en clorofíceas (Figura 4-4).

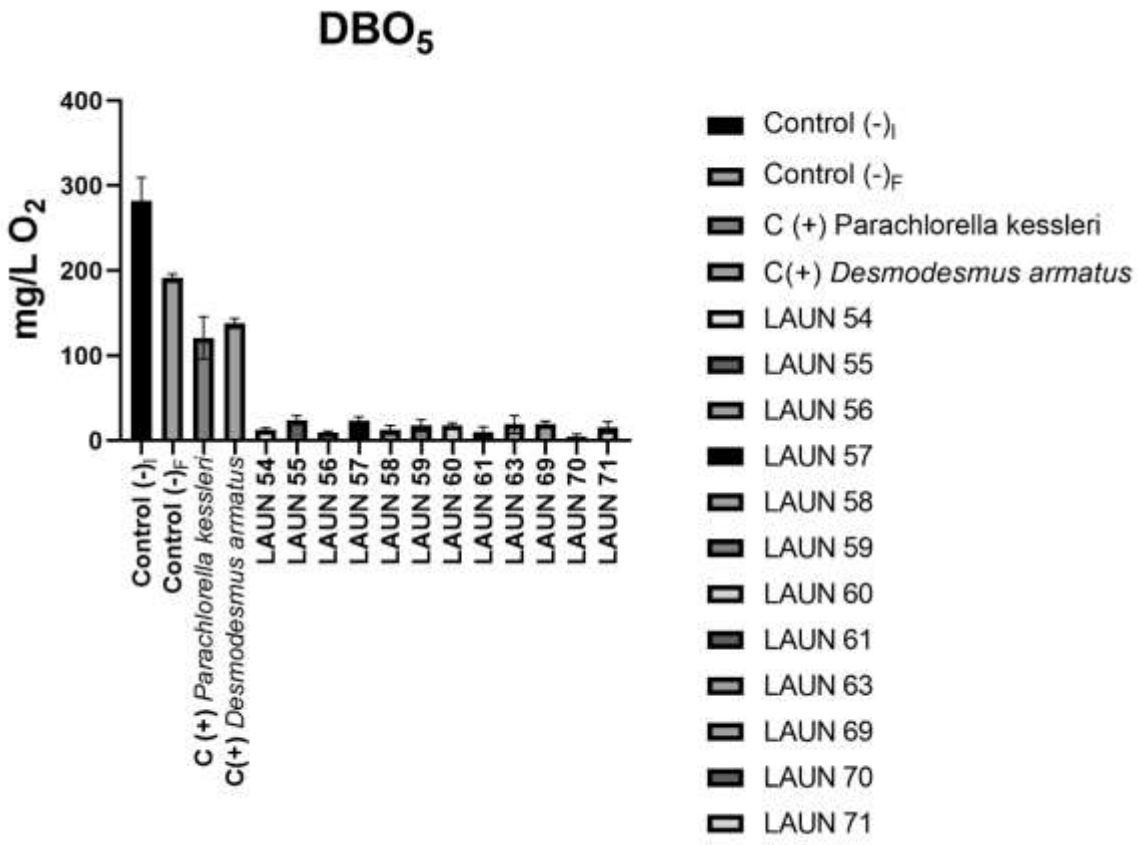


Figura 4-4: Reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO_5) por parte de las cepas de cianobacterias luego de 4 días de digestión en agua residual sintética. Diferencias significativas del p=0.01

4.4 Discusión

El tratamiento de aguas residuales por parte de cianobacterias es una alternativa eficiente al evaluar remoción de iones y reducción de la demanda química y biológica de oxígeno dada la alta flexibilidad metabólica de sus maquinarias celulares, además de que su cultivo masivo es menos costoso que otros tratamientos biológicos (Ahmad, 2022), siendo prudente monitorear

constantemente la concentración de las principales fuentes de macronutrientes dado que a concentraciones excesivas se puede dar una disminución de la actividad bioremediadora por parte de estos organismos (Su, 2020), de esta forma será posible tener un parámetro optimizado de dilución para cada sustrato.

Se propone un tratamiento simultaneo por parte de cianobacterias filamentosas y clorofitas, con lo que se abarca un mayor espectro de compuestos a remover de aguas residuales como es propuesto por El-Sheekh *et al.* (2022), de esta forma se facilita una dinámica poblacional que optimiza los recursos metabólicos de ambos organismos, un soporte físico para la comunidad de microalgas facilitando el diseño de biorreactores que optimicen el área de contacto con el sustrato.

La captación de nitrógeno por parte de las microalgas en general se da por distintas rutas, dependiendo de la fuente de nitrógeno biodisponible, siendo la ruta de la enzima nitrato reductasa la principal dada la alta disponibilidad de este ion en aguas y suelos, es altamente soluble en medios acuosos y estable en condiciones ambientales (Mohsenpour *et al.*, 2021; Ross *et al.*, 2018; Taiz *et al.*, 2014). Sin embargo, ésta ampliamente reportada la eficiencia de las clorofitas para la remoción del ion nitrato (C. Y. Chen *et al.*, 2020; Halfhide *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2022) siendo esto consecuente con lo observado en las cepas LAUN83 (*P. kessleri)* y LAUN84 (*D. armatus)*, las cuales presentaron los mejores resultados de remoción frente a las cianobacterias probadas (Figura 4-1). Sin embargo, las cepas de cianobacterias LAUN 70 (*Leptolyngbya sp*) y LAUN 71 (Synechococcales cyanobacterium) demostraron una disminución altamente significativa ($p = 0.01$) de nitratos respecto al control final, siendo una opción viable para el tratamiento de aguas residuales dadas las capacidades de remoción de otros iones y materia orgánica, además de su notable capacidad de producción de biomasa. Otro punto a tener en cuenta según Lin *et al.* (2022), consiste en que los reactores en configuración BATCH demuestran poca eficiencia, con un promedio de remoción entre 3.51 y 16.0 $mg*L^{-1}*d^{-1}$, los investigadores señalan que la configuración de reactor en biopelículas con flujos lentos de agua residual ($5.8L*d^{-1}$), promueven una mejor remoción de nitrato

(24mg*L^{-1}), lo que sugiere que la matriz de sostenimiento de las microalgas facilita el contacto con el ion nitrato que a su vez facilita la asimilación por parte de la microalga. Las cianobacterias LAUN utilizadas forman colonias filamentosas entretejiendo una red de filamentos y matriz extracelular que, según Zhang *et al.* (2022) y Sepehri *et al.* (2020), además de facilitar la exposición al ion, aumenta la densidad celular por área e incrementa en más del 100% la presencia de enzimas periplásmicas encargadas de la asimilación de nitrógeno, lo que puede explicar las tazas de remoción de nitratos (150 – 200mg*L^{-1}*$4d^{-1}$) y que en el mismo sentido, podría superar la eficiencia de remoción presentada por *P. kessleri* y *D. armatus*. Por otro lado, es notable la disminución de nitratos de forma espontánea en el medio de cultivo (C-i / C-f), esto se debe a que el medio en sí mismo representa un ambiente altamente reductor debido a las altas concentraciones de glucosa, ocasionando la reducción espontanea de los iones nitrato hacia nitritos (Miranda, 2018), para los cuales los ensayos de detección utilizados no poseen sensibilidad.

El fosforo es de los principales nutrientes que causan eutrofia en ecosistemas acuáticos (Lavrinovics *et al.*, 2021), las microalgas como todos los organismos requieren de fósforo para sus procesos fisiológicos como síntesis de ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos, entre otras moléculas, suelen captarlo en forma de fosfatos y ortofosfatos además de tener la capacidad de almacenarlo en exceso en forma de gránulos de fosfato o de volutina (Larsdotter, 2006). En aguas residuales, la eficiencia de remoción juega un papel fundamental en la escogencia de los organismos a utilizar, Ahmad (2022), menciona eficiencias del 92% de remoción de fosfatos por parte de *Phormidium sp.*, y rendimientos del 98% de remoción de fosfatos en *Geitlerinema sp,* resultados que coinciden con los obtenidos por las cianobacterias LAUN, además éstas presentan diferencias altamente significativas (p= 0,01) en todos los tratamientos respecto al control negativo final. Las cianobacterias LAUN54 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN56 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN58 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN59 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN60 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN61 (Synechococcales cyanobacterium),

LAUN63 (Synechococcales cyanobacterium) y LAUN71 (Synechococcales cyanobacterium también muestran diferencias altamente significativas (p= 0,01) frente a *D. armatus,* demostrando eficiencia superior a la reportada por Sepehri *et al.* (2020) y Nur & Buma (2019) en *P. kessleri* y *D. armatus* con porcentajes de remoción de 67% y 78% respectivamente. En promedio, las cianobacterias LAUN muestran porcentajes de remoción de 95% para este nutriente, esto indirectamente indica una acumulación y aprovechamiento de fósforo por parte de los microrganismos y así, un mayor rendimiento en la acumulación de biomasa en las cepas (Mtaki *et al.*, 2021; Sepehri *et al.*, 2020; Torres-Valenzuela *et al.*, 2019).

La materia orgánica es la principal fuente de carbono para microorganismos heterótrofos y mixótrofos, esto significa que altas tasas de remoción de materia orgánica (evaluada por la cantidad total de materia orgánica oxidable “DQO”) indica indirectamente la efectividad del crecimiento en estos organismos (C. Y. Chen *et al.*, 2020) y en este caso particular, de las cianobacterias LAUN. Se observó diferencia altamente significativa (p = 0.01) en la reducción de DQO en cepa LAUN71 (Synechococcales cyanobacterium) con respecto al control positivo de *P. kessleri*, sugiriendo una mayor eficiencia en la oxidación de materia orgánica por parte de la cepa (85.4%), sin esto significar una baja remoción por parte de las demás cepas LAUN que está entre 34.2 y 65%, Jebali *et al.* (2015), utilizó *Scenedesmus sp.* en distintas concentraciones de materia orgánica para medir la DQO obteniendo al final del tratamiento tasas de remoción del 93.7% siendo comparables con los resultados obtenidos por LAUN71 (Synechococcales cyanobacteria) y que a su vez son significativamente mayor que los controles. De la misma manera se observa una disminución espontánea de materia orgánica en el control, esto debido a la oxidación de macromoléculas que tiene lugar en medios acuosos por la acción de moléculas de agua, oxígeno disuelto o aniones SO_4^- (Guerra-Rodríguez *et al.*, 2018), que se presentan en los procesos de aireación de los reactores y en la elaboración del medio de cultivo.

No toda la materia orgánica oxidable en la columna de agua está biodisponible y por tanto, es un factor de decisión para la selección de microrganismos para

procesos de biorremediación de aguas residuales basados en la facilidad metabólica para utilizar compuestos orgánicos de distintas naturalezas (El-Sheekh *et al.*, 2022; Kumar & Bera, 2020; Takáčová *et al.*, 2015). La totalidad de las cepas LAUN mostraron diferencias altamente significativas (p= 0.01) con respecto a los controles, indicando el papel que juega el metabolismo de los microorganismos en la remoción de materia orgánica y la cantidad de ésta aún presente al finalizar los periodos de digestión. Por otro lado, los datos muestran que las cianobacterias se desempeñan mejor que los controles positivos *P. kessleri* y *D. armatus*, dado que existen diferencias altamente significativas (p=0.001) entre los doce tratamientos con cianobacterias y dichos controles alcanzando en promedio hasta un 37% más de remoción, esto significa que hay mayor eficiencia de remoción de materia orgánica biológicamente oxidable por parte de las cianobacterias que indirectamente sugiere una mayor versatilidad metabólica, esto apoyado en la menor cantidad de material oxidable de manera biológica en el agua residual sintética. Nur & Buma (2019), muestran rendimientos en la remoción de DBO_5 del 24% por parte de *Spirullina.platensis*. El-Sheekh *et al.* (2022), muestra porcentajes de remoción en la DBO_5 de 51% con diatomeas y Ahmad (2022), referencia tratamientos con *Nostoc muscorum* y *Anabaena variabilis* con rendimientos de 54 y 56% respectivamente, demostrando que las cianobacterias LAUN presentan resultados significativamente mejores que los reportados en literatura para otras especies de cianobacterias y algas con tiempos de digestión de 4 días, siendo candidatas a ser utilizadas en tratamientos de remoción de materia orgánica con mayores eficiencias que los tratamientos biológicos tradicionales (Ahmad, 2022).

4.5 CONCLUSIONES

Las cianobacterias LAUN 61 (Synechococcales cyanobacterium), LAUN70 (Synechococcales cyanobacterium) y LAUN71 (Synechococcales cyanobacterium) presentan los mejores rendimientos del cepario para la remoción de iones nitrato con promedios de 88.33, 95.83 y 77.50% respectivamente, así

mismo, presentan rendimientos de remoción de iones fosfato de 97, 95 y 98%, remoción de la DQO de 63.62, 49.48 y 85.41%, y con reducción de la DBO_5 de 93.67, 98.24 y 94.53%.

Se proponen las cepas de cianobacterias LAUN en general, dados los hallazgos realizados en los ensayos, para procesos de biorremediación y utilidad industrial, ya que se encontró que porcentualmente todas las cianobacterias son superiores, en la mayoría de los parámetros evaluados, a los controles de *D. armatus* y *P. kessleri*, clorofíceas tradicionalmente utilizadas para tratamientos de aguas residuales.

4.6 BIBLIOGRAFÍAS

Ahmad, I. Z. (2022). The usage of Cyanobacteria in wastewater treatment: prospects and limitations. *Letters in Applied Microbiology*, *75*(4), 718–730. https://doi.org/10.1111/lam.13587

Chen, C. Y., Kuo, E. W., Nagarajan, D., Ho, S. H., Dong, C. Di, Lee, D. J., & Chang, J. S. (2020). Cultivating Chlorella sorokiniana AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. *Bioresource Technology*, *302*(January), 122814. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122814

Chen, Z., Shao, S., He, Y., Luo, Q., Zheng, M., Zheng, M., Chen, B., & Wang, M. (2020). Nutrients removal from piggery wastewater coupled to lipid production by a newly isolated self-flocculating microalga Desmodesmus sp. PW1. *Bioresource Technology*, *302*(January), 122806. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122806

de-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. (2008). Involvement of INDOLE-3-ACETIC ACID produced by the growth-promoting bacterium Azospirillum spp. in promoting growth of Chlorella vulgaris. *Journal of Phycology*, *44*(4), 938–947. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00533.x

de Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnologia*, *5*, 85–90.

El-Sheekh, M., El-Dalatony, M. M., Thakur, N., Zheng, Y., & Salama, E. S. (2022). Role of microalgae and cyanobacteria in wastewater treatment: genetic engineering and omics approaches. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *19*(3), 2173–2194. https://doi.org/10.1007/s13762-021-03270-w

Giraldo, M. (2012). Aislamiento y caracterización de microalgas formadoras de tapetes microbianos asociados a un cultivo hidropónico de plantas halófitas Isolation and Characterization of The Microbial Mats Associated to a Hydroponic Culture of Halophytic Plants. *Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*. http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/6792/4/0654092_00000_0000.pdf

Githinji, L. J. M., Musey, M. K., & Ankumah, R. O. (2011). Evaluation of the fate of ciprofloxacin and amoxicillin in domestic wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution*, *219*(1–4), 191–201. https://doi.org/10.1007/s11270-010-0697-1

Gkotsis, P., Peleka, E., & Zouboulis, A. (2020). The use of natural minerals in a pilot-scale MBR for membrane fouling mitigation. *Separations*, *7*(2), 1–13. https://doi.org/10.3390/separations7020024

Guerra-Rodríguez, S., Rodríguez, E., Singh, D. N., & Rodríguez-Chueca, J. (2018). Assessment of sulfate radical-based advanced oxidation processes for water and wastewater treatment: A review. *Water (Switzerland)*, *10*(12). https://doi.org/10.3390/w10121828

Halfhide, T., Dalrymple, O. K., Wilkie, A. C., Trimmer, J., Gillie, B., Udom, I., Zhang, Q., & Ergas, S. J. (2015). Growth of an Indigenous Algal Consortium on Anaerobically Digested Municipal Sludge Centrate: Photobioreactor Performance and Modeling. *Bioenergy Research*, *8*(1), 249–258. https://doi.org/10.1007/s12155-014-9513-x

Imase, M., Watanabe, K., Aoyagi, H., & Tanaka, H. (2008). Construction of an artificial symbiotic community using a Chlorella-symbiont association as a model. *FEMS Microbiology Ecology*, *63*(3), 273–282. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00434.x

Jebali, A., Acién, F. G., Gómez, C., Fernández-Sevilla, J. M., Mhiri, N., Karray, F., Dhouib, A., Molina-Grima, E., & Sayadi, S. (2015). Selection of native Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel

production. *Bioresource Technology*, *198*, 424–430. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.037

Ji, F., Zhou, Y., Pang, A., Ning, L., Rodgers, K., Liu, Y., & Dong, R. (2015). Fed-batch cultivation of Desmodesmus sp. in anaerobic digestion wastewater for improved nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, *184*, 116–122. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.144

Kumar, A., & Bera, S. (2020). Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation. *Bioresource Technology Reports*, *12*(October), 100584. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100584

Larsdotter, K. (2006). *Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate* (p. 36).

Lavrinovics, A., Murby, F., Ziverte, E., Mezule, L., & Juhna, T. (2021). Increasing Phosphorus Uptake Efficiency by Phosphorus-Starved Microalgae for Municipal. *Microorganisms*, *9*.

Lin, Y., Koutsospyros, A., Braida, W., Christodoulatos, C., Terracciano, A., & Su, T. L. (2022). MicroAlgal Biofilm Reactor (MABR) – Evaluation of Biomass Support Materials and Nitrate Removal Performance. *Environmental Processes*, *9*(2). https://doi.org/10.1007/s40710-022-00574-y

Miranda, F. (2018). Purificación de agua : eliminación de nitratos , nitritos y compuestos orgánicos utilizando catalizadores en polvo y estructurados. In *Universidad Nacional Del Litoral* (Vol. 1, Issue 4). www.univeersidaddellit.com

Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., & Gutierrez, T. (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of the Total Environment*, *752*(September 2020), 142168. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168

Mousavi, S. A., Sarshad Ghahfarokhi, M., & Soltani Koupaei, S. (2020). Negative impacts of nomadic livestock grazing on common rangelands' function in soil

and water conservation. *Ecological Indicators*, *110*(November 2019), 105946. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105946

Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. P. (2021). Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (Chlorella vulgaris). *Annals of Microbiology*, *71*(1). https://doi.org/10.1186/s13213-020-01618-0

Nur, M. M. A., & Buma, A. G. J. (2019). Opportunities and Challenges of Microalgal Cultivation on Wastewater, with Special Focus on Palm Oil Mill Effluent and the Production of High Value Compounds. *Waste and Biomass Valorization*, *10*(8), 2079–2097. https://doi.org/10.1007/s12649-018-0256-3

Park, S., Kim, J., Park, Y., Son, S., Cho, S., Kim, C., & Lee, T. (2017). Comparison of batch cultivation strategies for cost-effective biomass production of Micractinium inermum NLP-F014 using a blended wastewater medium. *Bioresource Technology*, *234*, 432–438. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.074

Ponte, W. M. L., Talaverano, N. Z., Huaynate, A. O., Cafferata, E. A., & Gallegos, M. C. (2022). Efficiency of microalgae cultures for nutrient removal from domestic wastewater. *Advances in Environmental Technology*, *8*(1), 73–81. https://doi.org/10.22104/aet.2022.5069.1374

Rengifo, A. L., Peña, E., & Benitez, N. (2012). Efecto de la asociación alga-bacteria Bostrychia calliptera (Rhodomelaceae) en el porcentaje de remoción de cromo en laboratorio. *Biología Tropical*, *60*(September), 1055–1064.

Ross, M. E., Davis, K., McColl, R., Stanley, M. S., Day, J. G., & Semião, A. J. C. (2018). Nitrogen uptake by the macro-algae Cladophora coelothrix and Cladophora parriaudii: Influence on growth, nitrogen preference and biochemical composition. *Algal Research*, *30*(December 2017), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.12.005

Sepehri, A., Sarrafzadeh, M. H., & Avateffazeli, M. (2020). Interaction between

Chlorella vulgaris and nitrifying-enriched activated sludge in the treatment of wastewater with low C/N ratio. *Journal of Cleaner Production*, *247*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119164

Su, Y. (2020). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 144590. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590

Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research*, *45*(11), 3351–3358. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.046

Suraraksa, B., Nopharatana, A., Chaiprasert, P., Bhumiratana, S., & Tanticharoen, M. (2017). Effect of Substrate Feeding Concentration on Initial Biofilm Development in Anaerobic Hybrid Reactor. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, *20*(3&4), 361–372. https://doi.org/10.29037/ajstd.357

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2014). Physiology Plants. In *Plants Physiology* (Quinta). Sinauer Associates Inc. http://www.sinauer.com/media/wysiwyg/tocs/PlantPhysiology5.pdf

Takáčová, A., Smolinská, M., Semerád, M., & Matúš, P. (2015). DEGRADATION OF BTEX BY MICROALGAE Parachlorella kessleri. *Petroleum & Coal*, *57*(2), 101–107.

Torres-Valenzuela, L. S., Sanín-Villarrea, A., Arango-Ramírez, A., & Serna-Jiménez, J. A. (2019). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de aguas mieles del beneficio del café. *Revista ION*, *32*(2), 59–66. https://doi.org/10.18273/revion.v32n2-2019006

Wang, Y., Wang, S., Sun, L., Sun, Z., & Li, D. (2020). Screening of a Chlorella-bacteria consortium and research on piggery wastewater purification. *Algal Research*, *47*(October 2019), 101840.

https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101840

Watanabe, K., Takihana, N., Aoyagi, H., Hanada, S., Watanabe, Y., Ohmura, N., Saiki, H., & Tanaka, H. (2005). Symbiotic association in Chlorella culture. *FEMS Microbiology Ecology*, *51*(2), 187–196. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.004

Zhang, H., Chen, X., Song, L., Liu, S., & Li, P. (2022). The mechanism by which Enteromorpha Linza polysaccharide promotes Bacillus subtilis growth and nitrate removal. *International Journal of Biological Macromolecules*, *209*(PA), 840–849. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.082

5. Capítulo 5: Actividad antimicrobiana y anticancerígena de cianobacterias colombianas

5.1 Introducción

La naturaleza es un recurso principal para nuevos medicamentos e ingredientes activos, con más de la mitad de todos los medicamentos contra el cáncer basados en estructuras químicas aisladas de plantas, invertebrados marinos y microorganismos (Girão *et al.*, 2019; Grkovic *et al.*, 2020). Estos organismos, al no tener protección física, como caparazones duros o espinas, han desarrollado estas armas químicas con fines de defensa o competencia, y algunas de ellas son sustancias bioactivas poco conocidas con potencial farmacológico como anticancerígeno, antiinflamatorio, antibiótico. agentes, etc. (Robles-Bañuelos *et al.*, 2022). En los últimos años, las cianobacterias se han convertido en un foco de estudio para moléculas bioactivas como toxinas y otros metabolitos secundarios (M. L. da S. Sousa, 2020). En su historia natural, las cianobacterias deben adaptarse a muchos entornos diferentes y para tal fin, desarrollaron la capacidad de producir metabolitos secundarios para superar los desafíos exógenos (M. L. Sousa *et al.*, 2019).

Los productos naturales de cianobacterias se convierten en una fuente prometedora y valiosa de nuevos compuestos biológicos y farmacológicos, habiéndose descrito más de 1600 compuestos producidos exclusivamente por estos microorganismos y la gran mayoría pertenece a las familias de compuestos policétidos (PK) y péptidos no ribosómicos (NRP). o híbridos de ambos, haciendo parte del metabolismo secundario de dichos organismos. Gran parte de esta amplia diversidad de moléculas han demostrado bioactividad antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antiinflamatoria, anticancerígena, antiviral, inmunosupresora y citotóxica, siendo un claro ejemplo de este tipo de moléculas

la dolastatina. uno de los más estudiados dada su fuerte actividad citotóxica al inhibir fuertemente la polimerización de la proteína tubulina (Ferreira *et al.*, 2021; Girão *et al.*, 2019).

En Colombia se han adelantado algunos estudios donde han encontrado actividad antifúngica y antimicrobiana (Cano, 2018), además de consorcios de cianobacterias con actividad larvicida y herbicida (Ayala, 2017; Becerra, 2017; Prato-Valderrama, 2013), también se han presentado resultados positivos como citotóxicos contra líneas cancerígenas; (Bayona Maldonado, 2014; Cano, 2018). A raíz de lo anterior surge la necesidad de ampliar la información sobre el potencial biotecnológico que presentan las cianobacterias del territorio colombiano como fuentes de nuevos compuestos para la industria agrícola y farmacéutica, den este sentido se realizó una aproximación biotecnológica a la actividad de extractos crudos y fracciones derivadas de los mismos para usos antimicrobianos y anticancerígenos.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Selección de Cepas de Cianobacterias

Se trabajó con las cianobacterias Colombianas de la Colección de Algas y Cianobacterias LAUN, colectadas en las localidades de San Andrés y Providencia, Islas del Rosario y Embalse la Regadera. Las cepas LAUN 29, LAUN 33, LAUN 34, LAUN 45, LAUN 47, LAUN 74, LAUN 75, LAUN 78, LAUN 79 y LAUN 81 dado que son de origen marino, se cultivaron en medio de Cultivo ASNIII (Andersen, 2005) y las cepas LAUN 55 y 69 se cultivaron en medio de cultivo BG11 en agua dulce (Andersen, 2005), bajo condiciones de iluminación a 100$\mu mol_{photons}/m^2$/seg, fotoperiodo 12:12, 25°C y 60 días de crecimiento. En previos análisis moleculares se determinaron los géneros que componen la colección y se seleccionan doce individuos representantes de dichos géneros: *Synechococcus sp.* (LAUN 29), *Baaleninema sp*. (LAUN 33, LAUN 45, LAUN 47),

Pleurocapsa sp. (LAUN 34), *Leptolyngbya sp.* (LAUN 55, LAUN 69), *Phormidium sp*. (LAUN 74, LAUN 75, LAUN 81), *Hyellla sp.* (LAUN 78), *Staniera sp*. (LAUN 79). Las cepas se cosecharon por tamizaje y enjuagaron con agua destilada para retirar los residuos de sales de los medios de cultivo y se congelan a -80°C para posterior deshidratación por liofilización y molienda con nitrógeno líquido en un mortero cerámico.

5.2.2 Selección de cepas Bacterianas

Para la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos de las cepas LAUN se buscó trabajar con dos cepas Gram$^-$, dos Gram$^+$ y un hongo. Se toman como organismo de prueba las bacterias *Escherichia. coli, Bacillus subtilis., Salmonella typhi., Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida. albicans,* las cuales provienen del American Tipe Culturing Colection (ATCC) bajo los códigos ATCC 33694, ATCC 6051, ATCC 6539, ATCC 12600, ATCC 18804 respectivamente.

5.2.3 Obtención de extractos y fracciones

Extractos Metanólicos

Para la generación de extractos metanólicos se siguió el protocolo implementado por (Ferreira *et al.*, 2021). Se usó 2g de biomasa liofilizada previamente macerada en mortero hasta la obtención de un polvo fino, el cual se dispuso en 50mL de metanol puro y se llevó a sonicación en baño sónico FisherBrand FB15053, por 5min a 30°C. Posteriormente se filtró el sobrenadante y se repitió la extracción dos veces más, cada una con 25mL de metanol puro.

El extracto resultante se secó en un rotoevaporador BUCHI R-210 a 30°C y una presión de 210mBar hasta evaporar todo el solvente. Una vez seco el extracto, se resuspendió en 12mL de metano puro realizando múltiples lavados, recuperando

todo el extracto en viales de 20mL previamente pesados y llevado a evaporación nuevamente bajo las mismas condiciones ya mencionadas.

Para determinar el rendimiento de cada extracto, se pesó nuevamente cada vial y se determinó el peso neto de cada extracto. Se tomó 40mg de cada extracto y se resuspendió en un vial de HPLC con 1mL de metanol ultrapuro (grado LC-MS), filtrando cada solución en filtros de poro 0,2µm de ser necesario.

Fraccionamiento de los extractos

El fraccionamiento de los extractos se realizó conforme a lo indicado por Ferreira *et, al.,* (2021) partiendo de extractos de 40mg/mL, los cuales se inyectaron en el equipo HPLC Alliance Waters e2695 con una columna “ACE 10C8x10mm” acoplada a una precolumna de las mismas características. La cromatografía se corrió bajo un gradiente final de 10% Acetonitrilo y 90%H_2O ultrapura y metanol ultrapuro como blanco a una velocidad de inyección de 3mL/min, el equipo fraccionó cada extracto en 8 fracciones de forma automática, cada una con intervalos de 1.3min en una placa de 48 posos para un volumen final de 4mL de cada fracción. Las placas resultantes se desecarón en un SpeedVac y se resuspendió cada extracto en 500µL de DMSO grado analítico y se almacenó a -20°C hasta su uso en cada prueba. Los extractos y fracciones metanólicas así como las pruebas citotóxicas se realizaron en el Centro Interdisciplinario de Investigaciones Marinas y Ambientales CIIMAR de Portugal.

5.2.4 Bioensayos

Análisis antimicrobiano

Condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas se activaron en medio de cultivo de caldo HBI para bacterias y caldo de cultivo Sabouroud para hongos durante 24 horas a 37°C en una incubadora “Innova®42 incubator shaker series”. De igual forma, se utilizó como controles positivos el antibiótico Kanamicina (1mg/mL) y el antimicótico Nistatina (1mg/mL) que inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico respectivamente.

Inoculación con extractos de cepas de LAUN

Se utilizó la metodología de discos de difusión, el diseño experimental consiste en tres cajas de Petri por microorganismo con agar HBI para bacterias y agar dextrosa Sabouroud para hongos, donde se utilizaron dos discos por cada extracto de las cepas de cianobacterias de LAUN; con 6 discos para cada placa, y una tercera placa Petri para el control negativo con DMSO y el control positivo. Cada microorganismo se sembró mediante la técnica de estriados múltiples, de tal manera que cada superficie libre de la placa de Petri quedara cubierta con el inóculo. Se realizó la siembra e inmediatamente la exposición a cada extracto (15µL por disco) y se incubó durante 24 horas a 37°C (Girão *et al.*, 2019). La capacidad inhibidora de cada extracto se cuantificó en función de la longitud del radio del halo de inhibición alrededor de cada disco.

Análisis anticancerígeno

Cultivo de tejidos

Se siguió el protocolo propuesto por Ferreira *et al.*, (2021). Dos líneas cancerosas HCT116; correspondiente a carcinoma de colon humano (cultivadas en medio McCoy) y MG63; correspondiente a osteosarcoma humano (cultivadas en medio DMEM) y 2 líneas celulares sanas, con códigos 3T3L1; correspondiente a fibroblastos (cultivados en medio DMEM) y HCMEC; correspondiente a células endoteliales (cultivadas en medio DMEM).

En el mantenimiento de los cultivos se utilizaron frascos acrílicos estériles translúcidos de 200mL, cada uno con 5mL de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular todos ellos con 25µL de cultivo celular antiguo resuspendido en 1mL de medio de cultivo nuevo estéril. Para ello, se aspiró el medio de cultivo antiguo y se enjuagó dos veces con 1mL de solución salina tamponada con fosfato (PSB). Posteriormente, se añadió 1mL de TrypLE al cultivo celular y se incubó a 37°C durante 5min. Cuando las células se separan de las paredes del recipiente, se neutraliza la acción enzimática de TrypLE con 5mL de medio fresco y se llevan a un tubo falcon estéril de 15mL para su posterior sedimentación en centrífuga a 1200 RPM durante 5min, se descarta el sobrenadante. y el sedimento celular se resuspendió en 1ml de medio estéril.

De la suspensión celular resultante se utilizaron 25µL en 5mL de medio estéril en un recipiente nuevo, donde deben crecer hasta llenar entre el 70 y 80% del campo visual en el microscopio a 400x (aproximadamente una semana de crecimiento), para repetir el procedimiento descrito anteriormente.

Para el conteo se usaron 20µL de la suspensión y se mezclaron en partes iguales con colorante azul Trypan y se llevaron a una Cámara de Conteo Celular Neubauer. Del conteo realizado se ajusta la concentración celular de $3.3x10^4$ y una viabilidad superior al 80%, así, las células se siembran en placas de 96 pozos a volumen final de 100 µL para ensayos de viabilidad celular con MTT.

Citotoxicidad

Para probar los extractos de las cepas de cianobacterias de LAUN, las líneas celulares cancerígenas se cultivaron durante 24H en la placa de 96 pozos.

Pasado este tiempo, se aspiró el medio y se reemplazó por 100µL de medio fresco con el extracto de las cepas LAUN correspondiente en cada pocillo a una concentración final de 0,5% del extracto durante 48 horas a 37°C. Después de la incubación, se añadieron 20µL de MTT (1mg de MTT/1mL de PSB) y se incubó durante 4H a 37°C. Confirmando la formación intracelular de cristales violetas (Formazan), se aspiró el sobrenadante y se añadieron 100µL de DMSO para disolver los cristales de formazan y posteriormente se leyó a 570nm en un lector de placas Biochrom EZ Read 800 Plus. La línea base se estableció con los controles negativos, los cuales se tomaron como 100% de supervivencia, el comportamiento de la absorbancia mantiene una relación lineal con la supervivencia posterior de cada extracto.

5.3 Resultados

5.3.1 Obtención de los fraccionamientos

Como resultado de los fraccionamientos se obtuvieron 8 fracciones correspondientes a tiempos de retención de 1’18’’ consecutivos para cada extracto metanólico crudo tal como se observa en los siguientes cromatogramas (Figura 5-1 1hasta la 5-12):

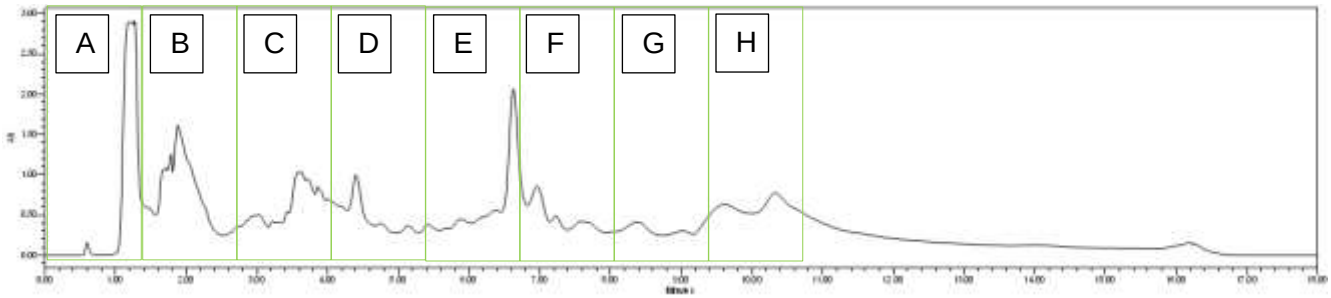


Figura 5-1: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 29

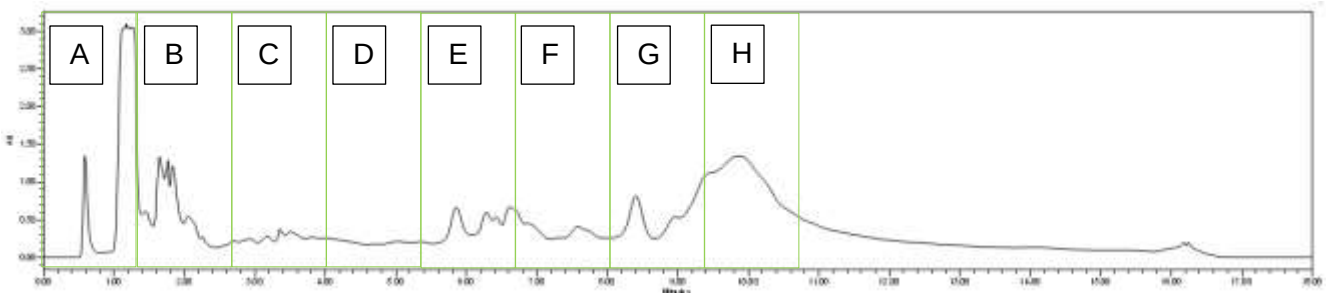


Figura 5-2: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 33

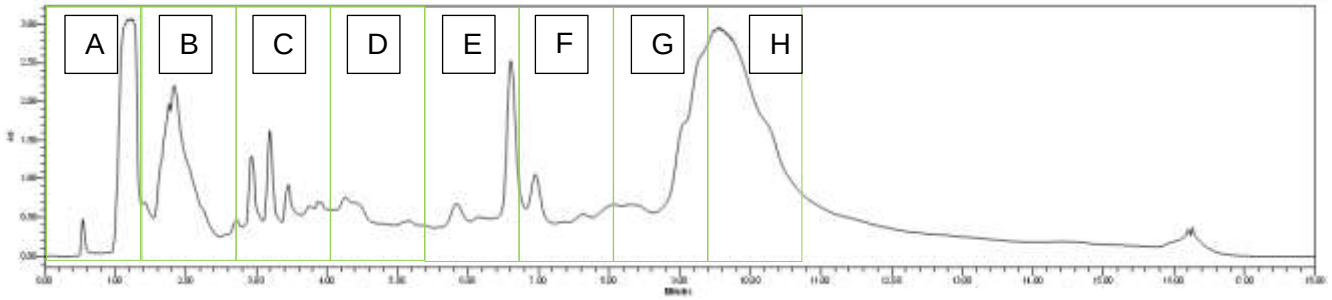


Figura 5-3: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 34

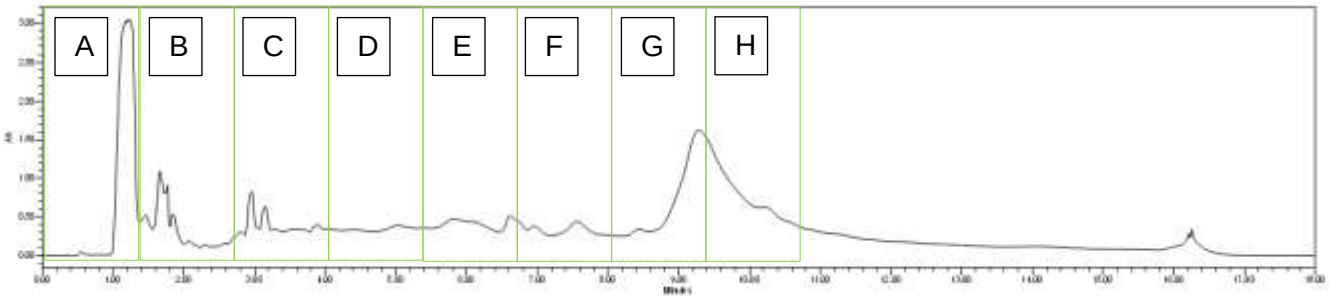


Figura 5-4: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 45

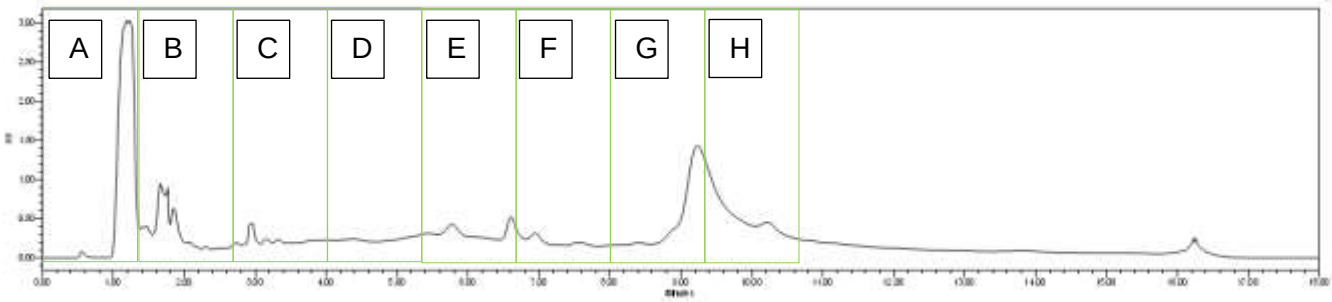


Figura 5-5: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 47

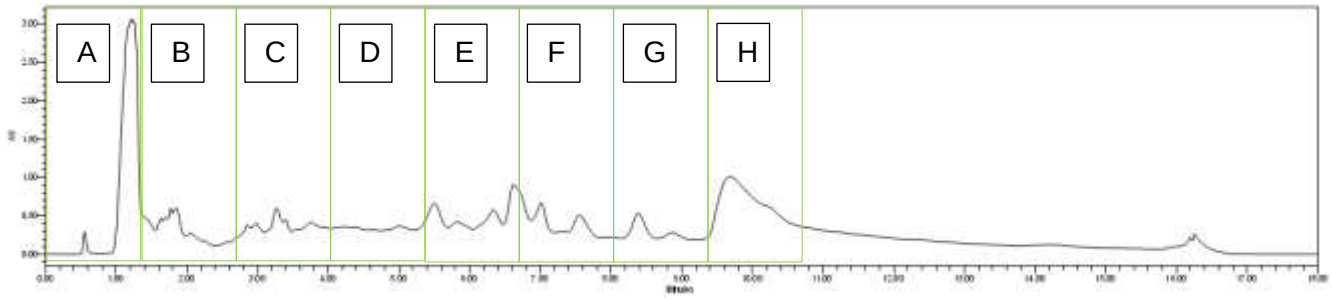


Figura 5-6: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 55

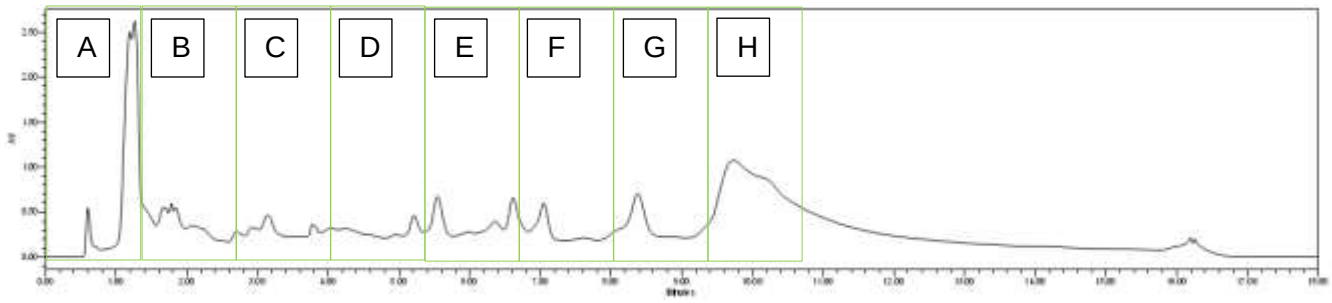


Figura 5-7: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 69

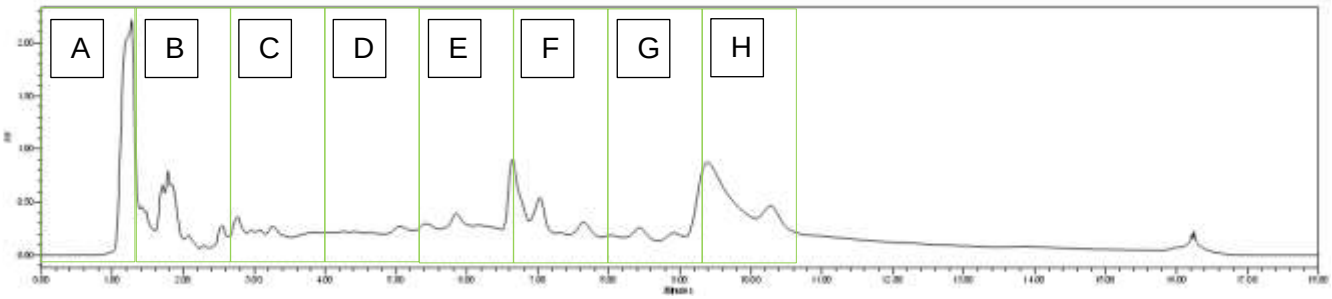


Figura 5-8: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 74

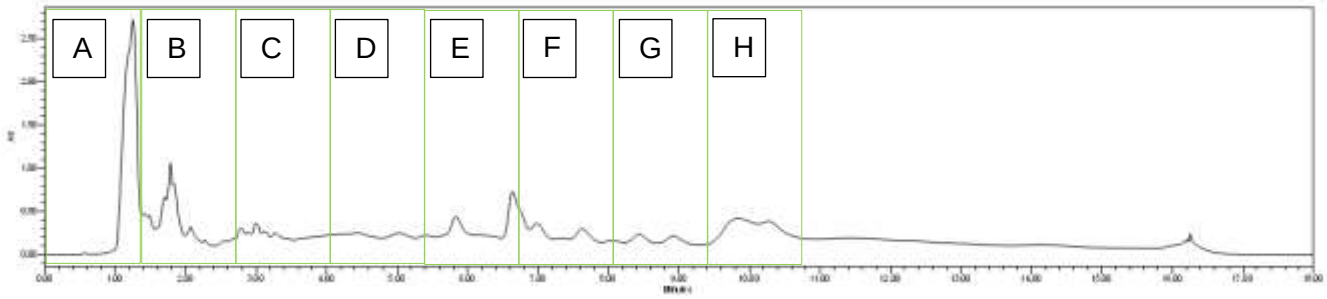


Figura 5-9: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 75

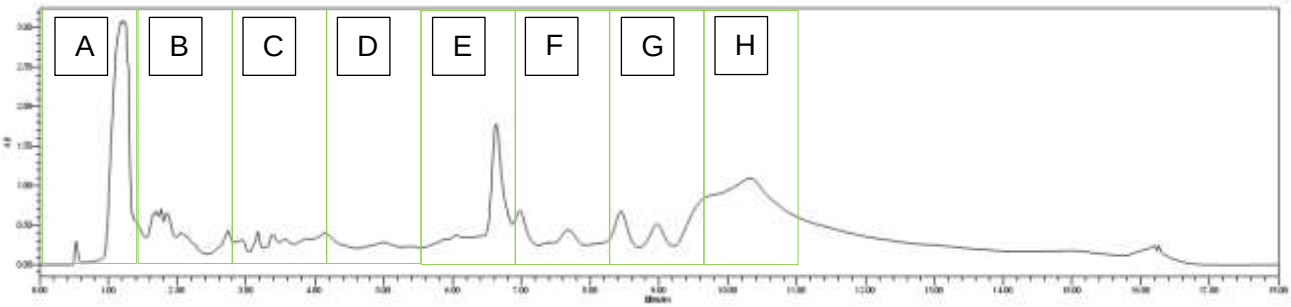


Figura 5-10: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 78

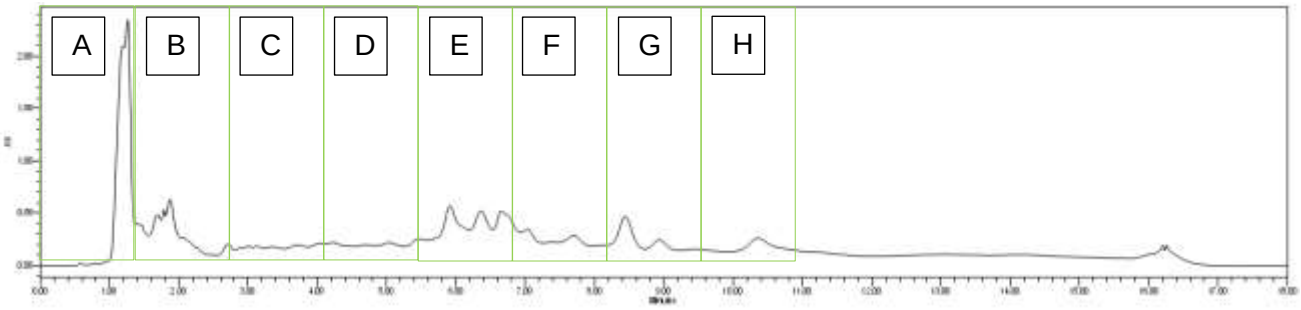


Figura 5-11: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 79

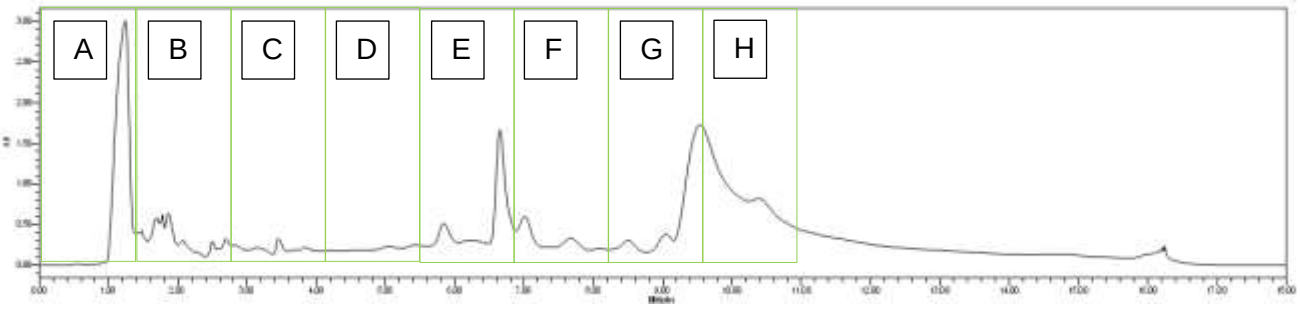


Figura 5-12: Cromatograma y fraccionamiento de la cepa LAUN 81

5.3.2 antimicrobianos

Evaluación de extractos de cepas de LAUN

Los extractos de las cepas de cianobacterias de LAUN ensayadas, no presentaron ningún tipo de actividad frente a las cepas seleccionadas de *Escherichia coli., Bacillus subtilis., Salmonella typhi., Staphylococcus aureus, Candida albicans*.

5.3.3 Actividad anticancerígena

Citotoxicidad de las Fracciones de las Cepas LAUN

Se registraron múltiples extractos con distintos niveles de toxicidad sobre las líneas celulares cancerígenas y sanas (Mg-63, HCT-116, 3T3L1 y HCMEC). Para la línea celular HCT-116 se encontró que el extracto "D" de la cepa LAUN 33 presenta una supervivencia del 33,18%, el extracto "A" de la cepa LAUN 74 que exhibe una supervivencia del 34,32% sobre la línea celular HCT-116, siendo estas, las fracciones más tóxicas contra la línea de Cáncer de Colon (Figura 5-13). A pesar de la actividad citotóxica mostrada por las cepas LAUN33 y LAUN74, el porcentaje de células cancerosas supervivientes está por encima de la línea de DMSO20%.

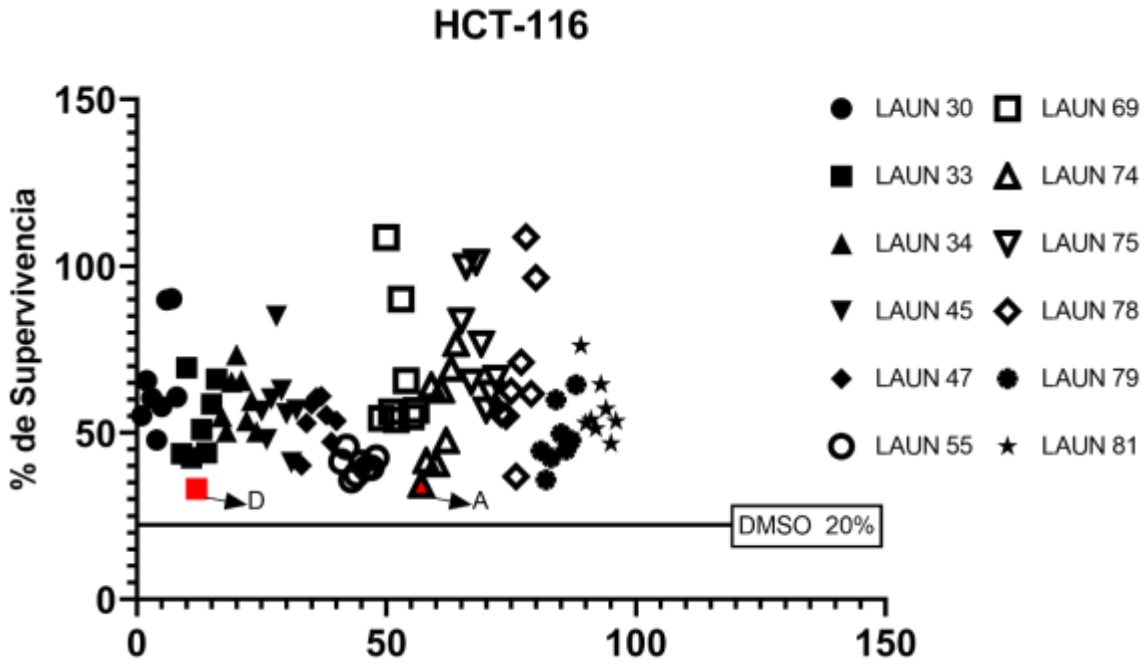


Figura 5-13: Prueba de Toxicidad en línea celular HCT-116. los extractos resaltados en rojo (LAUN 33D y LAUN 74A) indican las fracciones con mayor toxicidad en la línea del cáncer

De las 8 fracciones derivadas de cada extracto metanólico de las cepas LAUN ya mencionadas, se obtuvo que el extracto “E” de la cepa LAUN 33 tiene una

supervivencia del 39,28%, la fracción “F” de la cepa LAUN 33 tiene una supervivencia del 38,94%, el extracto "H" de la cepa LAUN 55 tiene una supervivencia del 38,28% y el extracto "F" de la cepa LAUN 74 presenta una supervivencia del 38,42% sobre la línea celular MG-63, siendo las fracciones mencionadas las más tóxicas. contra el osteosarcoma. (Figura 5-14).

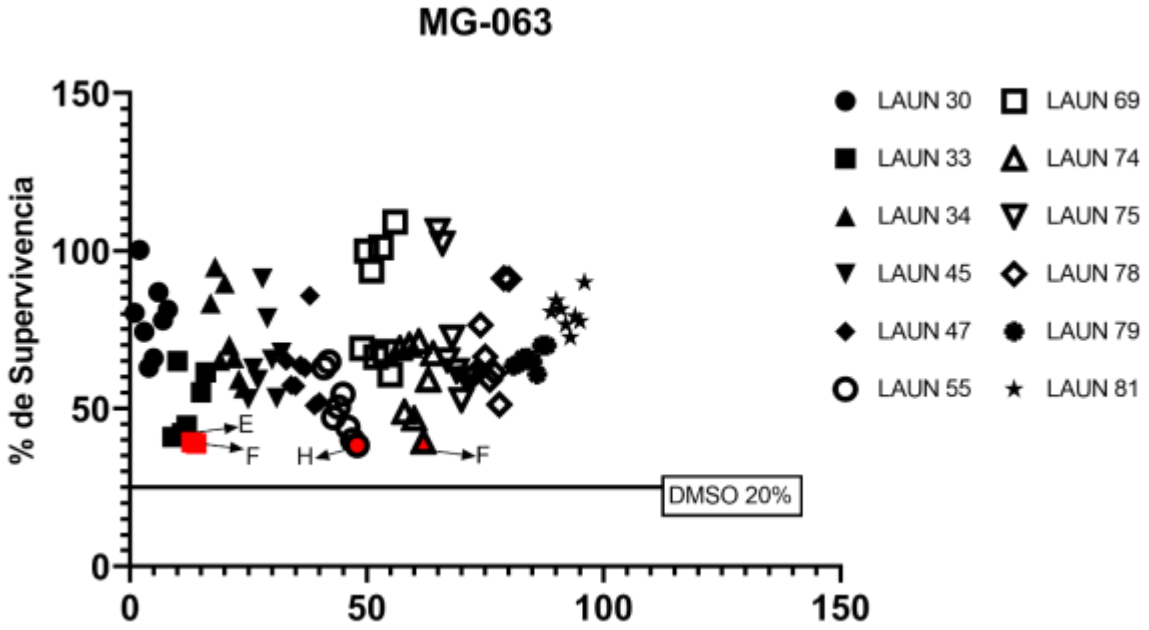


Figura 5-14: Prueba de toxicidad en línea celular MG-63, los extractos resaltados en rojo (LAUN 33E, F; LAUN 55H y LAUN 74F) indican las fracciones con mayor toxicidad en la línea cancerosa.

Por otra parte, las pruebas en líneas celulares sanas mostraron toxicidad leve en la fracción LAUN 47 “B” con una mortalidad celular del 56% para la línea 3T3L1 correspondiente a fibroblastos (Figura 5-15), sin embargo, se observó una acción estimulante del crecimiento de la línea celular en presencia de las fracciones LAUN 34C y LAUN 74D con concentraciones celulares de 121,7% y 112,3%, respectivamente, con respecto al control.

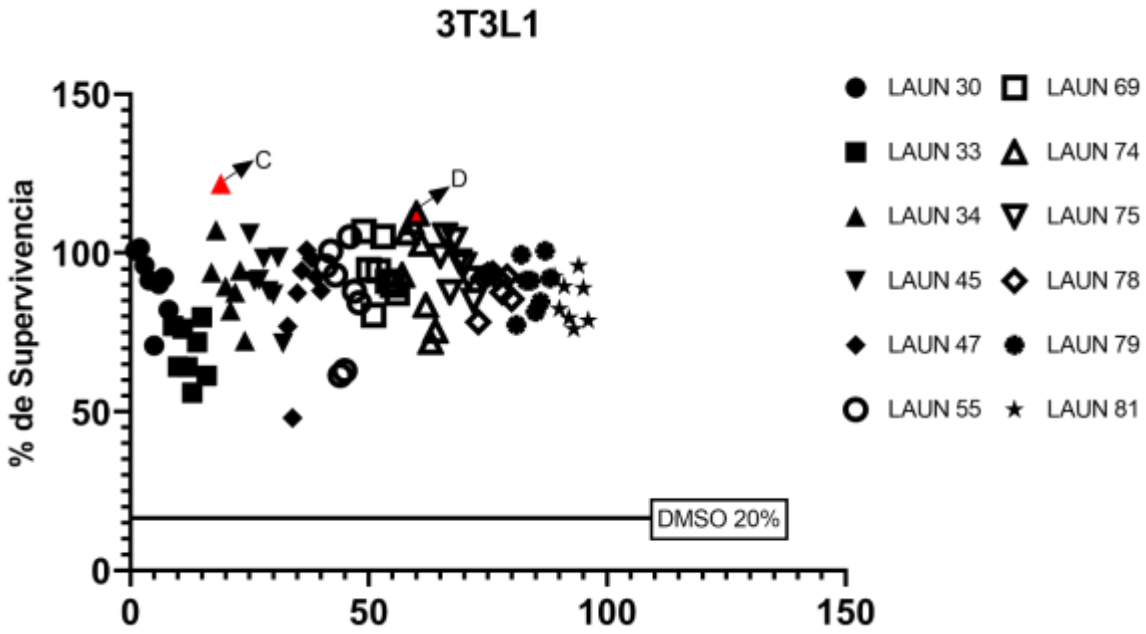


Figura 5-15: Prueba de toxicidad de la línea celular 3T3L1. Los extractos resaltados en rojo (LAUN 34C y LAUN 74D) indican las fracciones que demuestran estimulación del crecimiento en la línea celular.

Las fracciones LAUN 33 “E” y LAUN 55 “D” presentan una mortalidad del 66% y 56,4% (Figura 5-16), respectivamente, siendo las fracciones más tóxicas frente a la línea celular HCMEC. Sin embargo, cabe señalar que se observó una acción estimulante del crecimiento de la línea celular en presencia de la fracción LAUN 34B con concentraciones celulares del 127,1% en comparación con el control.

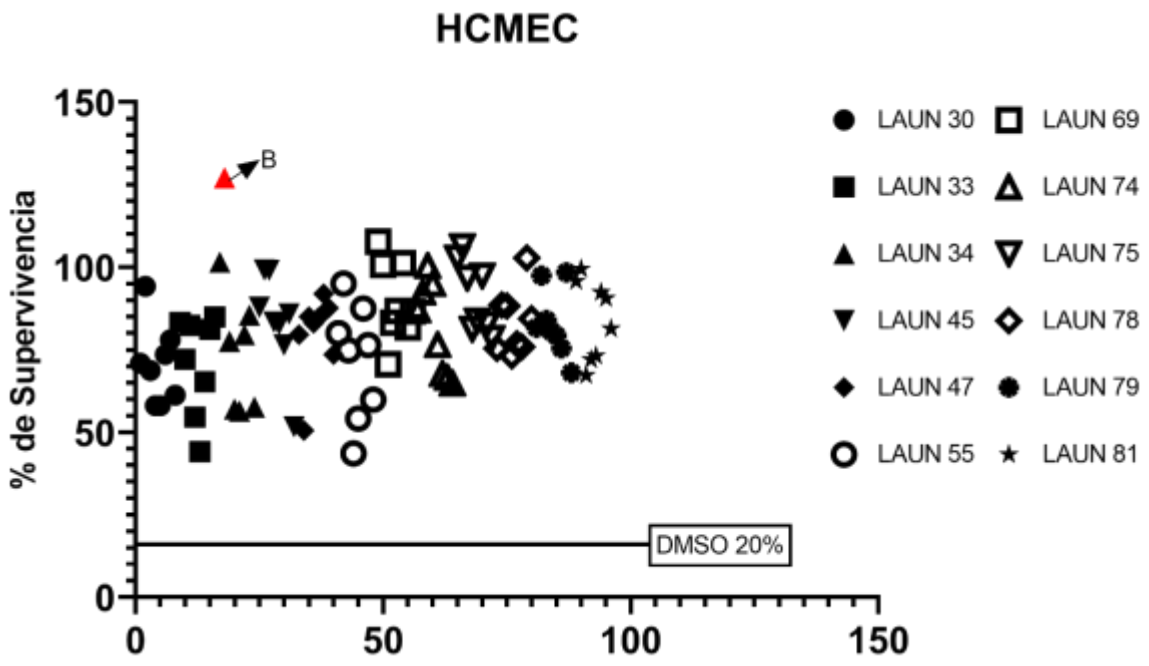


Figura 5-16: Prueba de toxicidad en línea celular HCMEC. El extracto resaltado en rojo (LAUN 34B) indica la fracción que demuestra estimulación del crecimiento en la línea celular.

5.4 Discusión

Los fraccionamientos realizados a las cepas LAUN (Figura 5-1 hasta la 5-12), arrojan 2 fracciones con valores de mortalidad debido a la toxicidad para la línea cancerígena HCT116 superiores al 60%, teniendo que para la línea cancerígena HCT116, la fracción “LAUN33D” (*Geitlerinema sp*.) no muestra un numero definido de picos por lo que se debe realizar un segundo fraccionamiento con la finalidad de visualizar y aislar el número de posibles compuestos allí presentes para así ensayar cada uno en HCT116. Por otro lado, la fracción “LAUN74A” (*Phormidium sp*.) presentan 2 posibles picos superpuestos con una abundancia relativa alta y un tercero de abundancia relativa mucho menor, siendo necesario un refraccionamiento y reevaluar la bioactividad de cada pico para su posterior identificación tal como lo sugiere Costa *et al.*, (2014); Ferreira *et al.*, (2021); Parida *et al.*, (2022).

De la misma forma, se encuentran 4 fracciones con actividad citotóxica, generando mortalidad superior al 60% sobre la línea cancerígena MG063. La fracción “LAUN33E” (*Geitlerinema sp*.) tiene aparentemente 4 picos con abundancias relativas distintas para cada pico, de la misma forma se observan 4 picos en la fracción “LAUN33F” (*Geitlerinema sp*.) con abundancias relativas similares entre sí. Así mismo, la fracción “LAUN55H” (cianobacteria Scynechoccocal) muestra 2 picos con una abundancia relativa del primer pico más alta que el segundo pico; sin embargo, el primer pico tiene un área bajo la curva que permite aseverar la posible presencia de más compuestos bajo ese mismo pico, por último, la fracción “LAUN74F” (*Phormidium sp*.) posee 2 picos bien definidos, sin embargo, esta fracción muestra una situación similar a la fracción “LAUN55H” (cianobacteria Scynechoccocal) dado que el primer pico de mayor abundancia relativa en la fracción presenta un área bajo la curva elevada con relación a su abundancia relativa lo que también permite inferir que existe más de un compuesto bajo el mismo pico de detección, lo que hace necesario un refraccionamiento variando la proporción de los solventes inyectados para así separar dichos picos de detección y así determinar el número de compuestos presentes para su posterior evaluación de bioactividad en la línea cancerígena, tal como es sugerido por Ferreira *et al.*, (2021, 2022); Parida *et al.*, (2022) y M. L. Sousa *et al.*, (2020).

Las fracciones “LAUN34C” (*Stanieria sp.*) y “LAUN74D” (*Phormidium sp*.) en la línea celular 3T3L1 y la fracción “LAUN34B” en la línea HCMEC muestran 5, 5, y 4 picos respectivamente los cuales no están notablemente separados lo que no permite descartar la presencia de picos ocultos bajo la curva de detección de los más aparentes, siendo estas fracciones, candidatas a refraccionamiento modificando las polaridades y concentración de solventes y así determinar la cantidad de compuestos presentes para su aislamiento y posterior evaluación de bioactividad(Ferreira *et al.*, 2021; Grkovic *et al.*, 2020; Guesmi *et al.*, 2022).

En cuanto a la actividad citotóxica en la línea celular HCT 116 (cáncer de colon), las fracciones de LAUN LAUN 33D (*Geitlerinema sp*.), LAUN 74A (*Phormidium*

sp.), tiene bioactividad importante sobre el 60% de mortalidad, resultados similares reportaron M. L. Sousa *et al.*, (2019, 2020) que tienen toxinas naturales de cianobacterias por cepas que pertenecen a los géneros *Phormidium* y *Nodularia*, estos exhiben citotoxicidad en líneas celulares de cáncer como HCT 116 cuyo objetivo está dirigido al metabolismo mitocondrial, resultados similares fueron informados por Parida *et al.*, (2022), quienes prueban extractos metanólicos y acetónicos de *Lyngbya majuscule* y *Lygbya martenciana* probándolo contra células HepG2 (carcinoma hepatocelular) encontrando en ambas especies una fuerte actividad anticancerígena en *L. majuscule*., así mismo, Cegłowska *et al.*, (2022) probaron las variantes de aeruginosamida AEG625 y AEG657 sobre células de cáncer de mama humano T47D y células de cáncer de hígado humano Huh7 (hepatoma humano), encontraron para ambas moléculas una toxicidad leve a la concentración más alta utilizada en los experimentos (60µg) solo en La línea celular T47D. Mediante varias técnicas cromatográficas, Ferreira *et al.*, (2022) aislaron dos nuevos compuestos de cianobacterias de tipo macrólido de *Leptothoe sp*. con alto efecto citotóxico sobre las células de cáncer de colon humano HCT116. Además, M. L. da S. Sousa, (2020), reporta bioactividad contra células de cáncer de colon (HT29 y HCT116) a partir de extractos de cianobacterias marinas, describe varias moléculas bioactivas como nocuolina A de *Nodularia sp*, portoamidas A y B de *Phormidium sp*., hierridins B y C de *Cianobium sp*., bartolosida A de *Nodosilinea sp*., bartolosida B y C de *Synechocystis salina* , teniendo que la nocuolina A disminuye el ATP y el oxígeno en las células cancerígenas analizadas, lo que propicia una función anormal de la respiración mitocondrial, además, las portoamidas A y B pueden inducir un estrés oxidativo leve en las células cancerosas y una potente inhibición mitocondrial, al mismo tiempo, encontraron que la bartolosida C disminuye el tamaño de células cancerosas así como la población de las mismas, finalmente, las hierridinas reducen los niveles de p21 y aumentan las proteínas p53 y C-myc, lo que desencadena la inhibición del crecimiento y la división de las células cancerosas.

En el sentido contrario, se puede observar un notable efecto promotor de crecimiento por parte de las fracciones LAUN 69B (*Leptolyngbya boryana*), LAUN 75D (Cianobacteria *Synechoccocal*) y LAUN 78F (*Hyella sp.*) dado que las células de la línea cancerígena HCT116 exhiben proliferaciones celulares de 108.6%, 101.2% y 108.7% respectivamente con respecto al control. El resto de los extractos ensayados no poseen niveles de toxicidad significativos contra la línea cancerígena.

Así mismo, las fracciones de las cepas de cianobacterias LAUN; LAUN 33E,F(*Geitlerinema sp*); LAUN 55H (cianobacteria Scynechoccocal), LAUN 74F (*Phormidium sp*) tiene sobre la línea celular cancerosa MG-063 (Osteosarcoma) un comportamiento relativamente tóxico, con más del 60% de mortalidad celular, estando este resultado en la misma línea que lo descrito por Costa *et al.*, (2014) quienes encuentran varios extractos crudos y fracciones con fuerte bioactividad de las cepas de colección de cianobacterias de LEGE contra múltiples líneas celulares de cáncer, incluida MG-063, donde las cepas *Pseudanabaena* y *Leptolyngbya fragilis* muestran rendimientos en mortalidad superiores al 90%. Por otro lado, Hassouani *et al.*, (2017) al realizar bioensayos anticancerígenos con extractos metanólicos de *Lyngbya aestuarii* en la línea celular MG-063, encontraron un efecto de estimulación de los extractos sobre la línea celular cancerosa, lo que demuestra la relevancia de nuestros hallazgos en la medida en que las cepas presentan una toxicidad en la línea de cáncer superior al 60%.

Por otro lado, se puede observar un notable efecto promotor de crecimiento por parte de las fracciones LAUN 69E y H (*Leptolyngbya boryana*) y LAUN 75A y B (Cianobacteria *Synechoccocal*) dado que las células de la línea cancerígena MG-063 exhiben proliferaciones celulares de 101.1%, 109.1% y 102.4%, 106.5% respectivamente con respecto al control. El resto de los extractos ensayados no poseen niveles de toxicidad significativos contra la línea cancerígena.

En cuanto a la relación con el control positivo (línea de base),Ferreira *et al.*, (2021) muestra 1 extracto por debajo de la línea control de estaurosporinas proponiéndolos como extracto tóxico pero Charitos *et al.*, (2019) consideran el IG50 % como indicador del poder del agente citotóxico natural, de esa manera,

las fracciones bioactivas de LAUN tienen una toxicidad que genera mortalidad celular superior al 60% en aproximadamente 5mg de todas las moléculas en estas fracciones sobre la línea base de DMSO20%, razón para continuar purificando los compuestos bioactivos, se podría continuar con la descripción de compuestos anticancerígenos potentes ya que aún se desconoce la concentración de los mismo en las fracciones evaluadas.

No obstante, las fracciones LAUN34B (*Stanieria sp.*), LAUN34C (*Stanieria sp.*) y LAUN74D (*Phormidium sp*), muestran un efecto promotor del crecimiento del tejido en las líneas celulares sanas 3T3L1 (fibroblastos) y HCMEC (células endoteliales cerebrales) proponiéndose ésta para su purificación y aislamientos, para así describir los compuestos bioactivos y proponerlos como candidatos a nuevos tratamientos en daños cutáneos y procesos de angiogénesis. De igual forma, Guesmi *et al.*, (2022), proponen fitoextractos como agente reepitelizante como tratamiento terapéutico de quemaduras cutáneas, Klinngam *et al.*, (2022) demostraron que los polimetoxiflavonoides del jengibre negro mejoran la estabilidad epidérmica, controlan la inflamación en explantes de piel y además describen este compuesto bioactivo como agente antienvejecimiento, pero no hay información reciente sobre esto con cianobacterias, siendo este un nuevo reporte en esta región.

En el sentido contrario, las fracciones LAUN 33E (*Geitlerinema sp*), LAUN 47B (*Baaleninema simplex*) y LAUN 55D (cianobacteria *Scynechoccocal*), poseen un efecto considerablemente toxico, reduciendo la viabilidad de líneas celulares sanas a cerca del 50% (48%, 44.1% y 43.6% respectivamente). Las demás fracciones no poseen una toxicidad significativa en ambas líneas celulares sanas. Con lo anterior, se resalta la alta toxicidad que presenta la fracción LAUN 33D en la línea celular HCT116 (66.8% de mortalidad) y en la línea celular MG063 (55.3%) siendo esta fracción candidata para refraccionamiento y aislamiento del compuesto que genera la actividad citotóxica específica para ambas líneas celulares, así mismo, esta misma fracción no genera efectos de toxicidad superiores al 50% en las líneas de control (35.9% en 3T3L1 y 45.4% en HCMEC). La fracción LAUN 74A presenta una alta toxicidad sobre la línea cancerígena

HCT116 (65.7% de mortalidad) pero no así en la línea celular MG063 (30.9% de mortalidad) lo que indica una alta selectividad del compuesto con actividad citotóxica hacia la línea HCT116 y porcentajes de toxicidad inferiores al 15% (7.1% en 3T3L1 y 13.1% HCMEC). La fracción LAUN 33E presenta una alta toxicidad en la línea cancerígena MG063 con una mortalidad de 60.7%, sin embargo, en la línea HCT116 la mortalidad de esta fracción no supera un 48% de mortalidad y respecto a las líneas 3T3L1 y HCMEC la mortalidad está por debajo del 56% (44.1% y 55% respectivamente). Respecto a la fracción LAUN 33F con una mortalidad del 61.1% Sobre MG063, exhibe una mortalidad del 56.1% sobre HCT116 y así mismo toxicidades de 28.1% y 34.7% sobre las líneas 3T3L1 y HCMEC respectivamente, confiriéndole una selectividad sobre la línea cancerígena MG063. Haciendo alusión a la fracción LAUN 55G con efecto toxico sobre la línea MG063 y HCT063, se observa mortalidad celular del 60% simultáneamente, mientras que en las líneas celulares 3T3L1 y HCMEC la toxicidad no asciende de 12.1% y 23.6% respectivamente siendo esta selectivamente tóxica contra las líneas de cáncer, pero no contra las células sanas. Finalmente, la fracción LAUN 74F presenta mortalidad celular del 60.6% sobre la línea MG063, pero una mortalidad menor (52.5%) sobre la línea celular HCT116, en el mismo sentido, esta fracción presenta comportamientos levemente tóxicos sobre las líneas celulares 3T3L1 y HCMEC (7.1% y 13.1% respectivamente), esto le confiere entonces una alta selectividad en cuanto a su acción citotóxica sobre la línea celular MG063.

Informes en América Latina muestran por análisis bioinformático un gen putativo para Nocuolina A de Nostocales, que sintetiza una Oxadiazina que desencadena la apoptosis en células cancerosas humanas (Lorenzi *et al.*, 2022). En Colombia existen pocos informes de actividad citotóxica por cianobacterias y no se identifican moléculas en la gran diversidad. de cianobacterias en el país (Cano, 2018; Prato-Valderrama, 2013; Quintana Bulla, 2011) De esta manera, es necesario mejorar la identificación de la diversidad de cianobacterias y su capacidad bioactiva, de manera que probablemente existan nuevos géneros de cianobacterias y nuevas familias de compuestos bioactivos.

5.5 Conclusiones

Se ha encontrado un interesante reservorio de compuestos bioactivos en cianobacterias colombianas, en este estudio es posible dilucidar el amplio potencial farmacéutico de nuestra biodiversidad en términos de citotoxicidad en líneas cancerosas, así como en promotores de crecimiento tisular, los cuales pueden ser propuestos como nuevas alternativas para el desarrollo de fármacos y tratamientos cosméticos. Asimismo, se genera una lista de cepas potenciales de cultivo masivo para la caracterización de las moléculas bioactivas objeto de las actividades descritas en este trabajo y se proponen las fracciones de la cepa LAUN LAUN 33D (*Geitlerinema sp.*) y LAUN 74A (*Phormidium sp.*), al re-fraccionamiento buscando compuestos puros contra el cáncer de colon (HCT-116), LAUN 33E,F(*Geitlerinema sp*); LAUN 55H(Scynechoccocales cianobacteria), LAUN 74F (*Phormidium sp*) a refraccionamiento buscando compuestos puros contra osteosarcoma(MG-063), finalmente las fracciones LAUN34B (*Stanieria sp.*), LAUN34C (*Stanieria sp.*) y LAUN74D (*Phormidium sp*), al refractionamiento buscando compuestos promotores de crecimiento puros en fibroblastos (3T3L1) y células endoteliales cerebrales (HCMEC). El conocimiento de los recursos naturales de nuestra región facilita su competitividad en los procesos de desarrollo industrial y farmacéutico.

5.6 Bibliografía

Andersen, R. A. (2005). Algal Culturing Techniques. In *Elsevier* (Vol. 1).

Ayala, F. (2017). *Búsqueda de compuestos con posible actividad a partir de cianobacterias marinas del Caribe colombiano. Tesis de Maestría*.

Bayona Maldonado, L. M. (2014). *Estudio químico y evaluación de la actividad citotóxica de metabolitos secundarios provenientes de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano*. http://www.bdigital.unal.edu.co/20433/

Becerra, L. (2017). *Evaluación del perfil metabólico de un consorcio de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano bajo condiciones de cultivo. (Tesis de Maestría).* https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/62324

Cano, J. (2018). Conservación in vitro y cultivo de Cyanoprocariotas bentónicas arrecifales de Providencia y Santa Catalina Islas, Colombia. Tesis de Maestría. In *Universidad Nacional de Colombia*.

Cegłowska, M., Kwiecień, P., Szubert, K., Brzuzan, P., Florczyk, M., Edwards, C., Kosakowska, A., & Mazur-Marzec, H. (2022). Biological Activity and Stability of Aeruginosamides from Cyanobacteria. *Marine Drugs*, *20*(2). https://doi.org/10.3390/md20020093

Charitos, G., Trafalis, D. T., Dalezis, P., Potamitis, C., Sarli, V., Zoumpoulakis, P., & Camoutsis, C. (2019). Synthesis and anticancer activity of novel 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(8), 4784–4794. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.015

Costa, M., Garcia, M., Costa-Rodrigues, J., Costa, M. S., Ribeiro, M. J., Fernandez, M. H., Barros, P., Barreiro, A., Vasconcelos, V., & 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*(December 2013), 98–114. https://doi.org/10.3390/md12010098

Ferreira, L., Morais, J., Preto, M., Silva, R., Urbatzka, R., Vasconcelos, V., & Reis, M. (2021). Uncovering the bioactive potential of a cyanobacterial natural products library aided by untargeted metabolomics. *Marine Drugs*, *19*(11). https://doi.org/10.3390/md19110633

Ferreira, L., Morais, J., Vasconcelos, V., & Reis, M. (2022). *Discovery of a Novel Potent Cytotoxic Compound from Leptothoe sp. 778069*, 46. https://doi.org/10.3390/blsf2022014046

Girão, M., Ribeiro, I., Ribeiro, T., Azevedo, I. C., Pereira, F., Urbatzka, R., Leão, P. N., & Carvalho, M. F. (2019). Actinobacteria isolated from laminaria ochroleuca: A source of new bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00683

Grkovic, T., Akee, R. K., Thornburg, C. C., Trinh, S. K., Britt, J. R., Harris, M. J., Evans, J. R., Kang, U., Ensel, S., Henrich, C. J., Gustafson, K. R., Schneider, J. P., & O'Keefe, B. R. (2020). National Cancer Institute (NCI) Program for Natural Products Discovery: Rapid Isolation and Identification of Biologically Active Natural Products from the NCI Prefractionated Library. *ACS Chemical Biology*, *15*(4), 1104–1114. https://doi.org/10.1021/acschembio.0c00139

Guesmi, F., Saidi, I., Abbassi, R., Saidani, M., Hfaiedh, N., & Landoulsi, A. (2022). Therapeutic potential of second degree's skin burns by topical dressing of Teucrium ramosissimum that promotes re-epithelialization. *Dermatologic Therapy*, *35*(5), 1–9. https://doi.org/10.1111/dth.15428

Hassouani, M., Sabour, B., Belattmania, Z., Atouani, S. El, Reani, A., Ribeiro, T., Ramos, V., Preto, M., Costa, P. M., Urbatzka, R., Leão, P., & Vasconcelos, V. (2017). *In vitro anticancer , antioxidant and antimicrobial potential of Lyngbya aestuarii (Cyanobacteria) from the Atlantic coast of Morocco*. *2508*, 4923–

4933.

Klinngam, W., Rungkamoltip, P., Thongin, S., Joothamongkhon, J., Khumkhrong, P., Khongkow, M., Namdee, K., Tepaamorndech, S., Chaikul, P., Kanlayavattanakul, M., Lourith, N., Piboonprai, K., Ruktanonchai, U., Asawapirom, U., & Iempridee, T. (2022). Polymethoxyflavones from Kaempferia parviflora ameliorate skin aging in primary human dermal fibroblasts and ex vivo human skin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *145*(September 2021), 112461. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112461

Lorenzi, A. S., Bonatelli, M. L., Varani, A. M., Quecine, M. C., & Bittencourt-Oliveira, M. do C. (2022). Draft genome sequence of the cyanobacterium Sphaerospermopsis aphanizomenoides BCCUSP55 from the Brazilian semiarid region reveals potential for anti-cancer applications. *Archives of Microbiology*, *204*(1), 1–7. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02602-1

Parida, S., Sriram, M., Bhanaja, C., Sahoo, B., & Bhanja, C. (2022). *In Vitro Screening of Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activities of Cyanobacteria Found Across Odisha Coast, India SATYABRATA DASH Maharaja Sriram Chandra Bhanja Deo University*. 1–19. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1272821/v1

Prato-Valderrama, J. A. (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.*

Quintana Bulla, J. I. (2011). *Evaluación de la toxicidad y del potencial bioactivo de afloramientos de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe Colombiano / Evaluation of toxicity and bioactive potential of benthic marine cyanobacteria from Colombian Caribbean Sea*. http://www.bdigital.unal.edu.co/8094/

Robles-Bañuelos, B., Durán-Riveroll, L. M., Rangel-López, E., Pérez-López, H. I., & González-Maya, L. (2022). Marine Cyanobacteria as Sources of Lead

Anticancer Compounds: A Review of Families of Metabolites with Cytotoxic, Antiproliferative, and Antineoplastic Effects. *Molecules*, *27*(15). https://doi.org/10.3390/molecules27154814

Sousa, M. L. da S. (2020). *Cyanobacterial bioactive metabolites for anticancer drug discovery: Characterization of new compounds and molecular mechanisms in physiologically relevant 3D cell culture*. https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/126888

Sousa, M. L., Preto, M., Vasconcelos, V., Linder, S., & Urbatzka, R. (2019). Antiproliferative effects of the natural oxadiazine nocuolin A are associated with impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Frontiers in Oncology*, *9*(APR), 1–13. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00224

Sousa, M. L., Ribeiro, T., Vasconcelos, V., Linder, S., & Urbatzka, R. (2020). Portoamides A and B are mitochondrial toxins and induce cytotoxicity on the proliferative cell layer of in vitro microtumours. *Toxicon*, *175*, 49–56. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.12.159

6. Conclusiones

La caracterización molecular, filogenética, metabólica y de funciones ecosistémicas de las cepas de la colección de algas y cianobacterias de la universidad nacional de Colombia (LAUN) objetivo de este estudio, demuestran la posible existencia de siete géneros nuevos de cianobacterias y 23 nuevas especies, así como una amplia capacidad para la producción de proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos, anticancerígenos, estimulantes de crecimiento celular y como biorremediadoras en procesos de tratamiento de aguas residuales tal como se muestra en la Tabla 6 1, teniendo que: Las cepas LAUN31, LAUN33, LAUN37, LAUN38, LAUN41, LAUN 71 y LAUN81 tienen capacidad para la producción de proteína aplicable a la industria nutraceútica. La cepa LAUN34 se destaca por la producción de carbohidratos aplicable a industrias nutraceúticas, farmacéuticas y bioenergéticas. Las cepas LAUN31, LAUN32, LAUN33, LAUN34, LAUN37, LAUN38, LAUN41, LAUN75, LAUN78, LAUN81 tiene una destacable capacidad de producción de pigmentos útiles en industrias farmacéuticas, nutraceúticas y textiles. Las cepas LAUN29, LAUN33, LAUN46, LAUN63, LAUN74, y LAUN81 poseen una destacable capacidad de producción de lípidos, aplicables a industrias nutraceúticas y bioenergéticas. Las cepas LAUN33, LAUN55 y LAUN74 poseen una potente capacidad anticancerígena. Las cepas LAUN34 y LAUN74 demuestran una potente capacidad de estimulación de crecimiento celular en células animales sanas y por último, las cepas LAUN54, LAUN55, LAUN56, LAUN57, LAUN58, LAUN59, LAUN60, LAUN61, LAUN63,

LAUN69, LAUN70 y LAUN71 demuestran una eficiente capacidad para la remoción de nitratos, fosfatos y materia orgánica de aguas residuales domésticas.

Tabla 6-1: Listado de cepas y potenciales usos según sus capacidades productivas

Código	Identificación de la Cepa	Capacidad Productiva Destacable
LAUN 29	*Synechococcus* sp. LAUN 29	Lípidos
LAUN 31	*Baaleninema* sp. LAUN 31	Proteína/Pigmentos
LAUN 32	*Baaleninema* sp. LAUN 32	Pigmentos
LAUN 33	*Baaleninema* sp. LAUN 33	Proteína/Pigmentos/Lípidos / Anticancerígenos
LAUN 34	*Pleurocapsa* sp. LAUN 34	Carbohidratos/Pigmentos/Estimulante de crecimiento celular
LAUN 35	Synechococcales cyanobacterium LAUN 35	
LAUN 37	*Baaleninema* sp. LAUN 37	Proteína/Pigmentos
LAUN 38	*Baaleninema* sp. LAUN 38	Proteína/Pigmentos
LAUN 41	*Baaleninema* sp. LAUN 41	Proteína/Pigmentos
LAUN 42	*Baaleninema* sp. LAUN 42	
LAUN 43	*Baaleninema* sp. LAUN 43	
LAUN 44	*Baaleninema* sp. LAUN 44	
LAUN 45	*Baaleninema* sp. LAUN 45	
LAUN 46	*Baaleninema* sp. LAUN 46	Lípidos
LAUN 47	*Baaleninema* sp. LAUN 47	
LAUN 54	Synechococcales cyanobacterium LAUN 54	Tratamiento de aguas(Fósforo, DBO_5,)
LAUN 55	Synechococcales cyanobacterium LAUN 55	Tratamiento de aguas/ Anticancerígenos
LAUN 56	Synechococcales cyanobacterium LAUN 56	Tratamiento de aguas (Fósforo, DBO_5,)
LAUN 57	Synechococcales cyanobacterium LAUN 57	Tratamiento de aguas (DBO_5,)
LAUN 58	Synechococcales cyanobacterium LAUN 58	Tratamiento de aguas (Fósforo, DBO_5,)
LAUN 59	Synechococcales cyanobacterium LAUN 59	Tratamiento de aguas (Fósforo, DBO_5,)
LAUN 60	Synechococcales cyanobacterium LAUN 60	Tratamiento de aguas (Fósforo, DBO_5,)
LAUN 61	Synechococcales cyanobacterium LAUN 61	Tratamiento de aguas (Fósforo, DBO_5,)

LAUN 63	Synechococcales cyanobacterium LAUN 63	Lípidos/Tratamiento de aguas (Fósforo, DBO_5,)
LAUN 69	*Leptolyngbya* sp. LAUN 69	Tratamiento de aguas
LAUN 70	*Leptolyngbya* sp. LAUN 70	Tratamiento de aguas(Nitógeno)
LAUN 71	Synechococcales cyanobacterium LAUN 71	Proteína/Tratamiento de aguas (Fósforo, DQO, DBO_5)
LAUN 72	Synechococcales cyanobacterium LAUN 72	
LAUN 73	Synechococcales cyanobacterium LAUN 73	
LAUN 74	Synechococcales cyanobacterium LAUN 74	Lípidos/Anticancerígenos/Estimulante de crecimiento celular
LAUN 75	Synechococcales cyanobacterium LAUN 75	/Pigmentos
LAUN 76	Synechococcales cyanobacterium LAUN 76	
LAUN 77	Synechococcales cyanobacterium LAUN 77	
LAUN 78	*Hyella* sp. LAUN 78	/Pigmentos
LAUN 79	*Stanieria* sp. LAUN 79	
LAUN 80	Synechococcales cyanobacterium LAUN 80	
LAUN 81	Synechococcales cyanobacterium LAUN 81	Proteína/Pigmentos/Lípidos
LAUN 82	*Hyella* sp. LAUN 82	

7. Recomendaciones

Con relación a los resultados obtenidos en esta investigación, es pertinente resaltar los altos valores de producción de proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos y MS, asi como la capacidad de algunas cepas para el tratamiento de aguas residuales y por tanto se sugiere optimizar los métodos de extracción de metabolitos mejorando la metodología de disrupción celular como primer barrera para la cuantificación, dado que es de gran importancia alcanzar rendimientos en la extracción mejor adaptados a la capacidad productiva real de las cianobacterias. Teniendo en cuenta lo anterior, se deberán realizar estudios enfocados al estrés fisiológico ya sea por condiciones de temperatura, fotoperiodos o variación de la carga nutritiva teniendo como objetivo lograr la optimización en la producción de proteínas, carbohidratos y lípidos con miras al aprovechamiento industrial de estos compuestos. En el mismo sentido se deberán establecer diseños experimentales que fomenten el estrés fisiológico respecto a la actividad fotosintética de las cianobacterias proyectándolo a el mejoramiento en la producción de pigmentos (ficobiliproteínas) en términos de cantidad y pureza.

Teniendo en cuenta los resultados moleculares y filogenéticos, es necesario continuar con la caracterización de cada especie y genero nuevo encontrado, motivo por el cual se requiere de la obtención y comparación de secuencias de la región 23S e ITS´s, asi como el análisis de las estructuras secundarias derivadas de estas secuencias.

Es necesario continuar con los aislamientos de moléculas derivadas del MS de las cianobacterias con técnicas de separación cromatográficas de alta resolución (HPLC) y su posterior identificación mediante patrones espectrales de descomposición de masas (LC/MS) y resonancia magnética nuclear(NMR), en función de la producción de compuestos anticancerígenos y estimulantes del crecimiento celular, dadas las implicaciones médicas y farmacológicas de nuevas

moléculas para el tratamiento del cáncer o productos enfocados en la regeneración de tejidos.

Finalmente, se propone en escalamiento de sistemas de tratamiento continuo o semicontinuo con las cianobacterias con capacidad biorremediadora comprobada, su comportamiento en volúmenes mayores de aguas residuales y de composición heterogénea con miras a la formulación de un acople tecnológico de tratamiento masivo de residuos con cianobacterias colombianas.

8. Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Colombia a través del proyecto “Convocatoria para apoyar iniciativas de intercambio de conocimiento que permitan fortalecer alianzas estratégicas” con código HERMES 52505, Bogotá, Colombia y el proyecto “Girardot” Especiales agradecimiento al centro interdisciplinar de investigación marina y ambiental CIIMAR por el programa de colaboración internacional en investigación, y Politécnico do Porto por permitir el acceso al laboratorio de cultivo de células para realizar los bioensayos anticancerígenos. Permiso de exportación de especímenes código ANLA-3100.