



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Potencial biotecnológico de cianobacterias provenientes de humedales de la región de Leticia, Colombia

**Biotechnological potential of cyanobacteria from
wetlands in Leticia region, Colombia**

Alejandra Andrade Silva

Universidad Nacional de Colombia
Sede Amazonia
Leticia, Colombia
2023

Potencial biotecnológico de cianobacterias provenientes de humedales de la región de Leticia, Colombia

**Biotechnological potential of cyanobacteria from
wetlands in Leticia region, Colombia**

ALEJANDRA ANDRADE SILVA

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Estudios Amazónicos - Línea Investigación

Director:

Dr. Sc. Luis Carlos Montenegro Ruiz

Línea de Investigación:

Ecosistemas, Biodiversidad y Conservación

Grupo de Investigación:

Limnología Amazónica

Universidad Nacional de Colombia

Sede Amazonia

Leticia, Colombia

2023

A Nubia Andrade y Sebastián Salcedo por enseñarme que la vida es corta, no es para cobardes y que siempre se puede volver a empezar, solo necesitas valor y muchas ganas.

Que descansen en paz.

29 y 30 de octubre 2022

Agradecimientos

Al programa PEAMA de la Universidad Nacional y la Sede Amazonia por permitirme acceder a la educación superior; por demostrar que los programas de inclusión si permiten

disminuir las brechas sociales en el país.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme terminar mis estudios de pregrado y maestría en tan prestigiosa institución.

Al profesor Luis Carlos Montenegro por sus enseñanzas, consejos y paciencia durante todos estos años; más que un profesor, un amigo para la vida.

Al profesor Santiago R. Duque por todo su acompañamiento en este camino y las enseñanzas recibidas.

A mi familia; mi mamá Alier Andrade, mi papá Henry Andrade, mis hermanas Paula y Daniela, a mis tías y primas, por ser los pilares en mi vida, mis motores en cada paso que doy.

A Christian Velásquez, por amarme y aceptarme como soy, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por aceptar que viva recogiendo animales, por convertirse en mi refugio y paraíso.

A mis mascotas que me han acompañado en todo el proceso de construcción de este documento: Mili, Pacha, Víctor, Aurora, Chiqui, Caneca, Sombra, Bella, Nube y el Negro.

A la familia que escogí, Angie y Santiago, ustedes hacen que mi vida en Bogotá sea mucho mejor. Muchas gracias por el apoyo, los regaños, las risas y los abrazos.

A mis compañeros de Laboratorio, Edward, Hugo Jefferson y Mohamed, por todo el apoyo y sugerencias.

Al Instituto de Investigaciones Imani por la financiación de este proyecto.

A la Sede Amazonia de la Universidad Nacional por el apoyo incondicional, en especial los docentes Eliana Jiménez y Allan Wood.

A Mónica Andrea Ríos por ser mi amiga en la Sede y estar siempre pendiente de mi bienestar académico, económico y emocional.

A Elkin por toda la asesoría brindada en los ensayos antimicrobianos y por sus consejos.

Y a todas aquellas personas que hicieron de este proceso algo maravilloso

¡Mil Gracias!

Resumen

Las cianobacterias son eubacterias que realizan fotosíntesis oxigénica. Presentes en el planeta desde el inicio de la vida (3.500 millones de años AP), están adaptadas a la mayoría de los ecosistemas acuáticos, terrestres y ambientes extremos. Se caracterizan por desarrollar un gran número de metabolitos secundarios, que en las últimas décadas han sido investigados por sus propiedades farmacológicas y su potencial industrial.

Debido a la antigüedad de estos microorganismos, su evolución ha conducido al desarrollo de distintos mecanismos de adaptación, que les ha permitido sobrevivir a las condiciones varias de múltiples ecosistemas. En este caso, se estableció como zona de análisis la región de la Amazonía.

Este estudio se realizó en Leticia, Amazonas, en humedales aledaños a la carretera Leticia – Tarapacá. Las muestras recolectadas se aislaron en medio nutritivo BG-11 sólido por técnica de rayado en agar y medio nutritivo BG-11 líquido por repliques continuos. Se aislaron e identificaron a partir de clave taxonómica y secuenciación molecular a partir de la subunidad 16s del rRNA, dos especies distintas: *Limnothrix vacuolifera*. y *Limnothrix sp.*, y se obtuvo un consorcio de *Oscillatoria sp.* y *Lyngbya sp.*

Se empleó la técnica de pozuelo para determinar cualitativamente la actividad antifúngica y antimicrobiana de los extractos polares y no polares provenientes de las cianobacterias cultivadas. Para ello, en cajas de Petri se sembraron: un hongo (*Penicillium*) y 3 bacterias, dos gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*) y una gram-positiva (*Enterococcus faecalis*), en las cajas ya inoculadas se agregó 1µl de los extractos en cada pozuelo y se observó la formación de un halo de inhibición alrededor del mismo. Las cepas 5 y 9 presentaron actividad antibacteriana frente a bacterias gram-negativas, La cepa 9 correspondiente a la especie *Limnothrix sp.* inhibió el crecimiento del hongo *Penicillium*. En las dos especies de *Limnothrix sp.* se determinó la presencia de genes codificantes para policétidos y péptidos no ribosomales, por amplificación de dominios KS de los PKS y Dominio de A de los NRPS. El consorcio no dio positivo para dichos genes.

Finalmente, se realizó una jornada de socialización de los resultados con estudiantes de la Institución Educativa San Juan Bosco, en la cual predominan indígenas Tikuna, Yukuna, Cocamas, Yaguas, Huitoto, Matapí y Bora, con el objetivo de dar a conocer qué son las cianobacterias e ilustrar el potencial existente de la región en referencia a estos organismos. A la jornada asistieron 307 estudiantes entre los cursos sexto, séptimo y octavo grado.

Palabras clave: cianobacterias, péptidos no ribosomales, policétidos, antimicrobianos, Amazonia Colombiana, metabolitos secundarios

Abstract

Cyanobacteria are eubacteria that perform oxygenic photosynthesis. Their existence dates back to the beginnings of life (3500 Ma ago), therefore, these organisms are highly adapted to both aquatic and terrestrial ecosystems in addition to external environments. Furthermore, one of the most remarkable characteristics of these organisms is that they develop a large number of secondary metabolites; these substances have been highly studied in last decades due to their pharmacologic properties and industry potential.

Due to the antiquity of these organisms, their evolution carried the develop of different adaptation mechanisms, allowing them to survive to the different environmental conditions of various ecosystems. In this case, the analysis zone corresponds to the Amazon region.

This study was done in Leticia, Amazonas, specifically in nearby wetlands along Leticia – Tarapacá Road. The collected samples were isolated in BG-11 solid nutrient medium by using Streak Plate Method and in BG-11 liquid nutritive medium by continuous replications. Two different species of cyanobacteria: *Limnothrix vacuolifera*. and *Limnothrix sp.* were isolated and then identified by using a taxonomic key (based in morphology) and by using molecular sequencing from subunit 16s of rRNA; additionally, a consortium of *Oscillatoria sp.* and *Lyngbya sp.*, were also obtained.

It was applied the Well diffusion method in order to determine (qualitatively) antifungal and antimicrobial activity of polar and non-polar extracts from cultured cyanobacteria. For this purpose, one fungus (*Penicillium*) and three bacteria, 2 gram-positives bacteria (*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) and one gram-negative bacterium (*Enterococcus faecalis*). In the previously inoculated petri dishes, it was added 1µl of the extracts of each well and the formation of an inhibition halo around it was observed. Specifically, Strains 5 and 9 presented antimicrobial activity against gram-negative bacteria; strain 9 corresponding to *Limnothrix sp.* inhibited the growth of *Penicillium* fungus.

In both species of *Limnothrix sp.*, the presence of polyketides and non-ribosomal peptides codifying genes was determined by amplification of KS domains of PKSs and A-domain of NRPS. For those genes, there was no positive result to the consortium.

Finally, a day of socialization of the results was carried out with students from the 'Institución Educativa San Juan Bosco' School, with the purpose of making a brief introduction about cyanobacteria, and give a presentation of the existing potential in reference to those organisms in the region. Most of the students of the school are Tikuna, Yukuna, Cocamas, Yaguas, Huitoto, Matapí and Bora indigenous people. To the activity they were 307 attendant students from sixth, seventh and eighth grades.

Key words: cyanobacteria, non-ribosomal peptides, polyketides, antibacterial, Colombian Amazon, secondary metabolite.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
1. CIANOBACTERIAS EN AMAZONIA: ESTADO DEL CONOCIMIENTO EN BIOPROSPECCIÓN.....	3
1.1 Resumen	3
1.2 Amazonia.....	3
1.3 Bioprospección en cianobacterias	4
1.4 Conclusiones	6
2. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN IN VITRO DE CIANOBACTERIAS PROVENIENTES DE HUMEDALES DE LA REGION DE LETICIA, AMAZONAS, COLOMBIA	7
2.1 Resumen	7
2.2 Introducción	7
2.3 Materiales y Métodos.....	10
2.3.1 Obtención del material vegetal	10
2.3.2 Aislamiento de Cepas y Mantenimiento	11
2.3.3 Identificación Morfológica de Especies.....	13
2.3.4 Identificación molecular de las cepas	13
2.4 Resultados y Discusión.....	14
2.4.1 Aislamiento de Cepas y Mantenimiento	14
2.4.2 Identificación morfológica de especies	17
2.4.3 Identificación Molecular.....	22
2.5 Conclusiones	26
3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DOS CEPAS DE Limnotrix y consorcio Oscillatoria y Lyngbya DE LA AMAZONIA COLOMBIANA	27
3.1 Resumen	27
3.2 Introducción	27
3.3 Materiales y Métodos.....	29

3.3.1	Producción de Biomasa en Laboratorio	29
3.3.2	Preparación de Extractos.....	30
3.3.3	Pruebas antimicóticas y antibacterianas	30
3.3.4	Identificación de PKs y NRPs	31
3.4	Resultados	32
3.4.1	Pruebas antimicrobianas	32
3.4.2	Presencia de PKs y NRPs	36
3.5	Discusión.....	37
3.6	Conclusiones.....	39
4.	LA IMPORTANCIA DE LO PEQUEÑO, EXPERIENCIAS CON COMUNIDADES ESTUDIANTILES DE LETICIA	41
4.1	Resumen.....	41
4.2	Introducción.....	41
4.3	Materiales y métodos	42
4.3.1	Área de estudio.....	42
4.4	Resultados y Discusión	48
4.5	Conclusiones.....	57
5.	Conclusiones y recomendaciones	59
5.1	Conclusiones.....	59
5.2	Recomendaciones.....	59
Anexo A: Medio BG – 11.....		61
Anexo 1.1: Solución Metales Trazas para medio BG-11		62
Anexo B: Guía a desarrollar en el taller de divulgación		63
Bibliografía		65

Lista de figuras

Figura 2-1 Mapa de la zona de muestreo. A) vía los Lagos, km 2 al 3.5. B) Kilómetros Vía Leticia – Tarapacá C) Leticia - Tabatinga. Tomada de: google Maps. 10

Figura 2-2 Zona de cultivo Laboratorio de Manejo y Gestión de Humedales de la Universidad Nacional de Colombia sede Amazonia. 11

Figura 2-3 Cultivo de cepas 5, 9 y 21 en medio nutritivo BG-11, con burbujeo constante. 12

Figura 2-4 Aislamiento de cepas puras por técnica de cubo de agar invertido. 12

Figura 2-5 *Limnothrix vacuolifera* mediciones del filamento, cepa 9, 400x..... 18

Figura 2-6 *Limnothrix sp.* mediciones del filamento, cepa 5, 400x. 19

Figura 2-7 *Limnothrix sp.* mediciones del filamento, cepa 5, 400x. 19

Figura 2-8 *Lyngbya sp.* mediciones del filamento, 1000x. 20

Figura 2-9 *Oscillatoria sp.* mediciones del filamento, 1000x. 21

Figura 2-10 Productos de PCR gen 16s. a) Escalera, b) cepa 5, c) cepa 9, d) control negativo. Gel de agarosa 1.5%. 23

Figura 3-1 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio. 33

Figura 3-2 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos no polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio. 33

Figura 3-3 A) Inoculación de *Penicillium* a un extremo y el extracto al otro. B) crecimiento del hongo 72 horas después de la inoculación. 33

Figura 3-4 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio. 34

Figura 3-5 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos no polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio. 34

Figura 3-6 A) Inoculación de *Penicillium* a un extremo y el extracto al otro. B) crecimiento del hongo 72 horas después de la inoculación. 35

Figura 3-7 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio. 36

Figura 3-8 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos no polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio. 36

Figura 3-9 Amplificaciones de (a) los dominios KS de policétidos y (b) los dominios A de los péptidos no ribosomales. Gel de PCR, 1) Marcador de peso molecular, 2) vacío, 3) Cepa 5, 4) Cepa 9, 5) Consorcio, 6) vacío 7) Control negativo 8) Control positivo *Microcistis aeruginosa*. El fragmento del gen dominio KS es aproximadamente 600 pb y el del dominio A es de 1000 pb. 37

Figura 4-1 A) Institución Educativa San Juan Bosco, B) Leticia. Tomada de: Google Maps.....	43
Figura 4-2 Estudiantes del Colegio Indígenas San Juan Bosco, cursos de 6to a 8vo.....	52
Figura 4-3 Definición de "Lama verde" según los conocimientos previos de los estudiantes.	53
Figura 4-4 Presentación de métodos de cultivo y aislamiento de cianobacterias a estudiantes del colegio Indígena San Juan Bosco.	54
Figura 4-5 Imagen de una Cianobacteria del género Oscillatoria a estudiantes del colegio Indígena San Juan Bosco.	55
Figura 4-6 Dibujo realizado por estudiante de 6to grado, en donde ilustra los materiales y el procedimiento necesario para el cultivo de microorganismos.	56

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Estudios realizados en la Amazonia colombiana que incluyen cianobacterias..	9
Tabla 2-2 Recolección de muestras en la vía Lagos y Leticia - Tarapacá.....	14
Tabla 2-3 Géneros de cianobacterias identificadas en cuerpos de agua de la Amazonia colombiana. Tomadas del libro: Microalgas acuáticas. La otra escala de la biodiversidad en la Amazonia colombiana (Núñez-Avellaneda y Marciales-Caro, 2008).....	22
Tabla 2-4 Comparación secuencia de la amplificación de la cepa 5 en la base de datos BLAST.....	24
Tabla 2-5 Comparación secuencia de la amplificación de la cepa 9 en la base de datos BLAST.....	25
Tabla 3-1 Organismos certificados para pruebas microbianas.	30
Tabla 3-2 Primers usados para la amplificación de los genes 16S y de los péptidos no ribosomales (NRPS) y Policétidos (PKS). En el primers 786R se usó una mezcla de las dos variables del primer.	31
Tabla 3-3 Resultados pruebas de inhibición de crecimiento microbianos por difusión de disco para cepa 5.	32
Tabla 3-4 Resultados pruebas de inhibición de crecimiento microbianos por difusión de disco para cepa 9.....	34
Tabla 3-5 Resultados pruebas de inhibición de crecimiento microbianos por difusión de disco para consorcio	35
Tabla 3-6 Resultados presencia de genes PKs y NRPs.	36
Tabla 4-1 Cronograma de actividades desarrolladas en el Colegio Indígena San Juan Bosco.	45
Tabla 4-2 Número de alumnos y Etnias a las que pertenecen los estudiantes del Colegio Indígena San Juan Bosco.	49

Introducción

Las cianoprocariontes comúnmente conocidas como cianobacterias son organismos microscópicos que carecen de una membrana nuclear definida (dominio procarionte) y poseen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica (Merel y otros, 2013). Aparecieron hace unos 3500 millones de años y se les considera los precursores de la presencia de oxígeno en el planeta y de la capa de ozono (O₃), modificando las condiciones atmosféricas que existían en ese entonces (Goldblatt y Otros, 2006).

Son organismos altamente complejos en diversidad y forma, que pueden ir desde formas unicelulares, hasta agregados coloniales (células envueltas en una matriz común) y filamentos (Abed y otros, 2009). Por su antigüedad y haber vivido en múltiples tipos de condiciones ambientales, las cianobacterias en la actualidad se encuentran en la mayoría de los ambientes acuáticos del mundo, entre el océano y lagos continentales, ambientes terrestres, en simbiosis e incluso en condiciones extremas tan particulares como aguas termales (Cantoral-Uriza y otros, 2017).

También esa antigüedad del grupo le ha permitido generar una compleja bioquímica en sus células, con la producción de muchos metabolitos secundarios **MS** (que son moléculas o compuestos orgánicos adicionales a los propios que le sirven para sobrevivir y que son “universales” a muchas otras formas de vida). Algunos de los metabolitos le sirven a las cianobacterias como mecanismo de protección contra depredadores y por competencia por el hábitat con otros grupos biológicos, incluso con las mismas algas (Brito y otros, 2015).

Los metabolitos secundarios (MS) de las cianobacterias han demostrado tener propiedades antifúngicas o antimicóticas (controlan el crecimiento de hongos), antivirales (controlan a virus), anticancerígenas (Abed y otros, 2009), una amplia gama de moléculas con capacidad de antibióticos para tratamiento de enfermedades, y como alimento o suplemento alimentario en las comidas (Torres-Ariño, 2004).

1. CIANOBACTERIAS EN AMAZONIA: ESTADO DEL CONOCIMIENTO EN BIOPROSPECCIÓN

1.1 Resumen

La región Amazónica se caracteriza por ser megadiversa en flora y fauna (Ruiz y otros, 2007; Tundisi y otros, 2014), y en términos de endemismo ninguna región se le aproxima, esto aplica también para microorganismos (Mittermeier y otros, 2002), sin embargo, los estudios realizados en cianobacterias son limitados y solo hasta mediados del siglo XX empezó a surgir el interés por el potencial biotecnológico que pueden llegar a poseer. El país con mayores investigaciones realizadas en cianobacterias es Brasil, seguido por Perú, Ecuador y Venezuela los cuales han realizado trabajos con un enfoque integral (clasificación taxonómica, molecular y potencial en bioprospección). En la Amazonia colombiana las investigaciones se han limitado a clasificación taxonómica y su función dentro de cuerpos de agua.

1.2 Amazonia

La Amazonia, también conocida como Panamazonia, Región Amazónica y Gran Amazonia, es la región suramericana con la mayor selva húmeda tropical del planeta (SINCHI, 2022). Con 7,4 millones de km², representa el 4.9% del área continental mundial y cubre extensiones diferenciables en los países de Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Perú, Surinam, Venezuela, y Guayana Francesa (Ramírez , 2013). En su mayor parte se encuentra drenada por el río Amazonas, el más largo y caudaloso del mundo, y los miles de afluentes que alimentan este sistema, los cuales pueden estar formados por aguas negras que nacen en los bosques amazónicos, poseen tonalidades oscuras, pH bajo y son oligotróficos; aguas blancas con origen en la cordillera de los Andes, color marrón amarillento, por la arcilla que arrastra, y pH cercano a la neutralidad; finalmente aguas mixtas que se originan a partir de la mezcla de las aguas entre ríos andinos y amazónicos (Núñez-Avellaneda y Duque, 2001; Núñez-Avellaneda, 2008)

Las interacciones entre el cauce principal y el plano de inundación generan interrelaciones entre la geología, geomorfología y ecología imposibles de separar y que por el contrario generan dinámicas ecosistémicas complejas que permiten el desarrollo de la diversidad tan característica del Amazonas. Este concepto planteado por Junk y otros (1989) y su función dentro del ordenamiento y estructura de los ríos y los sistemas acuáticos inundables de la Amazonia tales como Várzeas (Bosques y zonas inundables alimentadas por aguas blancas) e Igapós (Bosques y zonas inundables alimentadas por aguas negras), convierten esta región en un paraíso mega diverso en flora, fauna y riqueza cultural (Junk y otros, 1989; Junk y Wantzen, 2004; Neiff, 1990; Salcedo-Hernández y otros, 2012). A nivel microscópico la región Amazónica se transforma, las características antes mencionadas permiten el desarrollo de organismos complejos que conforman el fitoplancton y el perifiton, los cuales podrían llegar a dar respuestas a muchos de los interrogantes que se tienen sobre la dinámica de los ecosistemas acuáticos, ya que gran parte de los procesos y funciones de dichos sistemas comienzan por estos organismos (Núñez-Avellaneda, 2008).

1.3 Bioprospección en cianobacterias

Dentro del fitoplancton podemos encontrar los organismos más antiguos del planeta que son cianobacterias, conocidas en el siglo pasado como algas verde-azuladas o Cyanophyceae (Svrcek y Smith, 2004; Paerl y Huisman, 2009; Singh, Pathak, y Sinha, 2017; Corrales y otros, 2017; Salomon y otros, 2020). Son organismos microscópicos que carecen de una membrana nuclear definida (dominio Procariota) y poseen la capacidad de producir fotosíntesis oxigénica (Merel y otros, 2013).

Son organismos altamente complejos en diversidad y forma, que pueden ir desde formas unicelulares, hasta agregados coloniales (células envueltas en una matriz común) y filamentos (Valério y otros, 2009; Pineda-Mendoza y otros, 2011). Presentan una gran plasticidad morfológica y adaptabilidad a diversos tipos de ecosistemas, características que les confieren una ventaja para colonizar exitosamente diferentes sistemas acuático (Otten y Paerl, 2015; Palacio y otros, 2019), entre el océano y los lagos continentales, así como en condiciones extremas tales como manantiales termales a más de 80°C, rocas de desierto, regiones tropicales, en la Antártida, lagos hipersalinos, pantanos o en biotopos de zonas volcánicas (Whitton y Potts, 2000; Cantoral-Uriza y otros, 2017).

El tiempo y las condiciones han permitido que las cianobacterias desarrollen metabolitos secundarios (**MS**), los cuales no cumplen con las funciones vitales tales como, alimentación, reproducción y crecimiento, pero si permiten al organismo obtener alguna ventaja ecosistémica (Demain y Fang, 2001). Aunque aún no se conoce específicamente las funciones que poseen los MS en las cianobacterias, se han asociado a diversas condiciones, incluida la defensa contra otros organismos, actuando como antibióticos,

herbicidas, fungicidas, entre otros; también se reconocen como agentes transportadores de metales, facilitadores de simbiosis, como fotoprotectores, antioxidantes, efectores de diferenciación o aleloquímicos en la señalización (Sharif y otros, 2008; Pereira y Giani, 2014; Jones y otros, 2021).

Dentro de las investigaciones realizadas a nivel de potencial biotecnológico, se han encontrado metabolitos que ayudan a combatir el cáncer, trastornos cardíacos y autoinmunes o enfermedades infecciosas. También se les reconoce como agentes antimicrobianos y antifúngicos (Jones y otros, 2021).

El estudio de MS, potencial biotecnológico y bioprospección se ha venido desarrollando en la última década en países como Brasil, Venezuela y otros que hacen parte de la Amazonia y su principal afluente. De los primeros estudios en bioprospección en la Amazonia se encuentra el realizado por Fiori y otros, (2005) en la búsqueda de cepas fijadoras de nitrógeno de los sedimentos de los ríos Amazonas/Solimões aislando 5 géneros (15 especies) de cianobacterias fijadoras de nitrógenos, de las cuales *Nostoc*, *Calothrix*, *Cylindrospermum* y *Fischerella*, no habían sido aisladas en la región. Las muestras tomadas de 17 sitios geográficamente diversos; 16 pertenecientes a Várzeas y a un Ipagó. De los sitios muestreados fue recurrente observar el género *Nostoc* (100% de los sitios muestreados), seguido por *Fischerella* (76%), *Calothrix* (29%) y en menor proporción *Cylindrospermopsis* y *Anabaena*.

Torres y otros, (2020), investigaron las cianobacterias potencialmente tóxicas encontradas en el litoral de Santarém, río Tapajós. Se detectó la presencia de *Synechocystis aquatilis*, *Mycrocystis aeruginosa*, *Dolichospermum spiroides* y *Nostoc sp.*; exceptuando *Synechocystis aquatilis*, todas demostraron potencial para la producción de cianotoxinas. Especialmente aquellas del grupo de las hepatotoxinas que incluyen a las cilindrospermopsina y la microcistina, que afectan las células hepáticas humanas y pueden generar inflamaciones persistentes. De igual forma son bioacumulativas conllevando a contribuir al desarrollo de tumores cancerosos hepáticos (Freitas Da Silva, 2012).

Gomes y otros, (2021) investigaron cianobacterias provenientes de dos Estados de la Amazonia brasileña, Amapá y Tocantins, con el fin de evaluar el potencial inhibitorio frente a la enzima glucosamina de 63 cepas provistas por el centro biología de sistemas y genómica (UFPA) y cultivadas en medio nutritivo BG-11 bajo condiciones controladas de laboratorio. Se identificaron morfológicamente cianobacterias como *Synechococcus*, *Planktorhrix*, *Limnothrix*, *Nostoc* y *Merismopedia*. De las cuales *Limnothrix* y *Synechococcus* demostraron potencial inhibitorio frente a B- Glucosamina con tiempos aproximados de 30 min, y un resultado exitoso de 60 min en la cepa GRB01 correspondiente a *Synechococcus*.

De igual forma en Perú se han realizado investigaciones de exploración en cianobacterias, enfocados a la bioprospección. Aislado, cultivando *In vitro*, identificando molecular y bioquímicamente cepas de origen amazónico, como los trabajos de Grandez y otros, (2021), los cuales, con éxito, aislaron y caracterizaron molecular y bioquímicamente una cepa de *Anabaena sp.* colectada en el río Amazonas.

En la Amazonia Colombiana, aún no se registran trabajos realizados para cianobacterias, sin embargo, se pueden encontrar citadas en trabajos de biota acuática, uso, manejo y gestión de cuerpos de agua, limnología fluvial y alteración de ambientes acuáticos (Prieto y Arias, 2007).

1.4 Conclusiones

Se ha descubierto que en la Amazonia existe una amplia diversidad de cianobacterias que aún no han sido registradas, además se ha observado por medio de estudios moleculares que poseen algún componente bioactivo útil en la industria alimenticia, farmacéutica, entre otras.

Los estudios en torno a las cianobacterias son escasos, sin embargo, los que se han realizado han arrojado resultados positivos y de relevancia en bioprospección y bio-remediación

2. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN IN VITRO DE CIANOBACTERIAS PROVENIENTES DE HUMEDALES DE LA REGIÓN DE LETICIA, AMAZONAS, COLOMBIA

2.1 Resumen

La Amazonia Colombiana hace parte de la rica y mega diversa Panamazonia, y aunque le corresponde 483.119 km² las investigaciones ejecutadas en cianobacterias han sido relativamente pocos; hasta la fecha los trabajos realizados se han enfocado en la identificación morfológica y su papel e interacción con otros organismos en ambientes naturales, los estudios que comprenden cultivo, aislamiento, identificación molecular y bioprospección aún no han sido realizados y/o publicados. Debido a esto, el presente trabajo busca ser pionero en la obtención de una cepa aislada y cultivada en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Amazonia. Para lograr dicho objetivo se utilizó medio nutritivo BG-11 en sólido y líquido, se sembraron muestras provenientes de humedales en la periferia de la ciudad de Leticia, por estriado en placas, técnica de cubo invertido y repliques continuos. Del total de muestras recolectadas se logró aislar 2 cepas y 1 consorcio correspondiente a *Limnotrix vacuolifera*, *Limnotrix sp* y el consorcio *Oscillatoria* y *Lyngbya*.

Palabras claves: cianobacterias, *Limnotrix*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, Leticia, Amazonia, bioprospección.

2.2 Introducción

Las cianobacterias son procariotas ancestrales con la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica; a los cuales se les atribuye ser responsables de la atmósfera oxidante que hoy conocemos (Whitton, 2012) incentivando el desarrollo de la respiración aeróbica y la vida multicelular (Soo y otros, 2017); pueden encontrarse en una gran diversidad de hábitats, incluyendo ambientes extremos, que son el reto más grande de las formas de vida en la Tierra (Whitton, 2012).

Estos organismos además de poseer la capacidad de ser fotosintetizadores aeróbicos presentan otras adaptaciones que las hacen interesantes desde el punto de vista biológico y ecológico. Algunas especies presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (78% de la atmósfera terrestre se compone de N₂; Canope y otros, 2005; Abed y otros, 2009; Prato-Valderrama, 2013). También pueden formar asociaciones simbióticas con hongos formando especies de líquenes, o con helechos acuáticos como *Azolla sp.*, cuya cianobacteria simbiótica es *Anabaena azollae* (Sevillano y otros, 1982; Peña, 2019). Hay asociación con plantas como el género *Nostoc* con las *Haloragaceae* del género *Gunnera*, las cuales se recluyen en órganos glandulares especializados situados en el tallo (Burgos-Hernández y Castillo-Campos, 2017). Algunas especies son altamente tolerantes a condiciones extremas y pueden encontrarse en aguas termales a más de 60 °C, en lagos hipersalinos, o formando gruesas matas bentónicas en lagos de regiones polares (Bonilla, 2009). Además de su importancia ecológica, las cianobacterias también son reconocidas como una fuente prolífica de productos naturales biológicamente activos (Singh, Pathak, y Sinha, 2017); algunos de estos compuestos son tóxicos para una amplia gama de organismos (Brito y otros, 2015).

Tradicionalmente, las cianobacterias se han clasificado con base en caracteres morfológicos como el ancho de los tricomas, el tamaño de las células, los planos de división, la forma y disposición, la pigmentación y la presencia de caracteres como las vacuolas de gas y una vaina (Baker, 1992; Valerio y otros, 2009); sin embargo, debido a la flexibilidad de adaptación que poseen, las cianobacterias pueden llegar a presentar cambios fisiológicos por las condiciones del clima, hábitat, recursos, competencia de recursos e incluso condiciones controladas de laboratorio (Pineda-Mendoza y otros, 2011). Lo que según Komárek y Anagnostidis (1989) más del 50% de las cepas colectadas son o están mal identificadas.

Por ello, se propone para las nuevas investigaciones tener un enfoque polifásico (Sciuto y otros, 2012) el cual combina información de carácter morfológico, ecológico y fisiológico, con datos derivados de la secuenciación molecular a partir de marcadores moleculares altamente conservados y difícilmente modificables como el gen del ARN ribosómico; el 16S rRNA es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas.

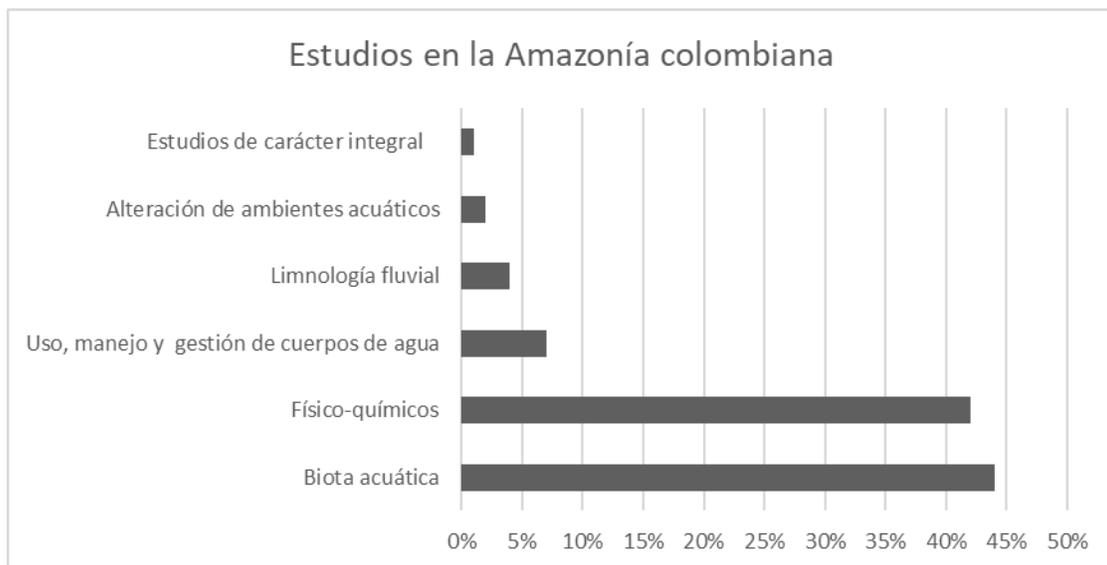
El gen ARNr 16s se ubica en la subunidad pequeña (30S) en los ribosomas, organelos cuya función es realizar la síntesis de proteínas en todos los organismos (eucariotas y procariotas; Peña, 2019). Es considerado como cronómetro molecular, debido a la capacidad que tiene para medir el cambio evolutivo, determinando así, relaciones filogenéticas entre organismos (Al-Haj y otros, 2016).

En la Amazonia colombiana el conocimiento de los ambientes acuáticos inicia en la década de los 90, a partir de la medición de variables físicas y químicas del agua, así como la colecta cualitativa y cuantitativa de fitoplancton y perifiton en las cuencas de los

ríos Amazonas, Putumayo, Caquetá y Guainía (Duque y otros, 2007; Núñez-Avellaneda, 2008).

Los estudios registrados para la Amazonia colombiana, en los cuales se puede encontrar información sobre cianobacterias, se pueden agrupar en cinco principales temáticas dentro de las cuales predominan los estudios enfocados en biota acuática (44%), características físicas y químicas (42%), seguidos de trabajos en uso, manejo y gestión de los cuerpos de agua (7%), limnología fluvial (4%), alteración de los ambientes acuáticos (2%) y estudios de carácter integral (1%) (Prieto y Arias, 2007).

Tabla 2-1: Estudios realizados en la Amazonia colombiana que incluyen cianobacterias.



Las investigaciones más importantes realizadas en referencia a perifiton y fitoplancton han sido desarrollados por Smith y Craven (1972), Duque (1988), Santamaría (1995), Prada y Donato (1996), Duque y Núñez-Avellaneda (1997a; 1997b), Camacho (1998), Duque y Núñez-Avellaneda (2000), Conforti y Nudelman (1994), Duque (1995), Núñez-Avellaneda y Duque (1998; 2000), Echenique y otros (2004), Torres-Bejarano (2006) y Palma (2011). Priorizando la identificación taxonómica y ecología de las comunidades fitoplanctónicas en ambientes acuáticos de la Amazonía.

Debido a esto, este trabajo tiene como objetivo ampliar el área de estudio referente a cianobacterias, logrando aislar y cultivar *in vitro* especies provenientes de humedales de la ciudad de Leticia - Amazonas; en esta ocasión realizando la identificación morfológica y molecular a partir de unidad ribosomal 16S.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Obtención del material vegetal

Para este estudio se recolectaron muestras de lagos y cuerpos de agua estacionales en la periferia del municipio de Leticia - Amazonas (Localización 1: 4°11'17.7"S 69°56'41.2"W, Localización 2: 4°10'30.4"S 69°56'24.3"W, Localización 3: 4°10'01.5"S 69°56'17.4"W, Localización 4: 4°06'35.6"S 69°56'42.5"W, Localización 5: 4°06'23.2"S 69°58'09.8"W), a una altitud de 82 msnm, recorriendo la vía Leticia - Tarapacá, desde el km 2 hasta el km 17 (figura 2.1).



Figura 2-1 Mapa de la zona de muestreo. A) vía los Lagos, km 2 al 3.5. B) Kilómetros Vía Leticia – Tarapacá C) Leticia - Tabatinga. Tomada de: google Maps.

Las muestras recolectadas proceden de cuerpos aledaños a la carretera Leticia – Tarapacá, en donde predominaban cuerpos de aguas negras y aguas blancas; las aguas negras se identificaron por las tonalidades oscuras que presentan, pH bajo y escasos nutrientes, mientras que las aguas blancas se caracterizan por contener grandes

cantidades de sedimentos, ricos en nutrientes, baja transparencia y pH cercanos a la neutralidad (Junk y otros, 1989; Núñez-Avellaneda y Duque, 2001; Salcedo-Hernández y otros, 2012). También se tuvo en cuenta aquellos cuerpos de agua en los que confluían vertientes de residuos orgánicos, desarrollos urbanos que cambian la limnología original del paisaje o una combinación de ambos (Pereira y otros, 2001; Pérez, 2003). Los periodos de colecta fueron entre los meses de marzo a julio del año 2021, aguas altas, y de transición de diciembre hasta abril (Andrade-Sossa, 2011).

Las muestras se tomaron de manera manual, se depositaron en tubos falcón de 50 ml con agua del lugar de procedencia y trasladadas al laboratorio de manejo y gestión de humedales de la Universidad Nacional de Colombia sede Amazonia (figura 2.2).



Figura 2-2 Zona de cultivo Laboratorio de Manejo y Gestión de Humedales de la Universidad Nacional de Colombia sede Amazonia.

2.3.2 Aislamiento de Cepas y Mantenimiento

Las muestras recolectadas se dejaron en reposo por 24 horas, luego fueron transferidas a tubos falcon de 15 ml con 5 ml de medio nutritivo BG-11, previamente esterilizado mediante autoclave a 121 °C durante 60 minutos a 103 KPa. Las muestras se adaptaron a las condiciones del laboratorio: fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad y 25° C +/- 2° C. Luego se sembraron en un Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio nutritivo BG-11 (Andersen, 2005; Ver anexo 1).

Una vez aclimatadas las muestras, se procedió a tomar una mota o filamentos por cada morfotipo presente y se realizó la siembra en medio nutritivo BG-11 sólido y líquido, por estriado en placas, técnica de cubo de agar invertido (Figura 2.4) y repliques continuos de acuerdo con Anderson (2005), debido al alto grado de contaminación por esporas de hongos y microorganismos propios del área circundante al laboratorio difíciles de controlar por los espacios físicos, las réplicas se realizaron cada 6 días. De igual forma se tomaron motas o filamentos y se sembraron en botellas de vidrio de 250 ml con 200 ml de medio BG-11 (figura 2.3). El crecimiento celular se determinó a partir de la observación diaria, se tomaron fotos de los medios de cultivo sólidos y líquidos, y se realizaron comparaciones entre imágenes, en medios líquidos se observó la intensidad del color y en medios sólidos los espacios colonizados, además se realizaron observaciones al microscopio óptico Olympus CX31 para determinar el grado de contaminación de la muestra, y continuar con los repliques.



Figura 2-3 Cultivo de cepas 5, 9 y 21 en medio nutritivo BG-11, con burbujeo constante.

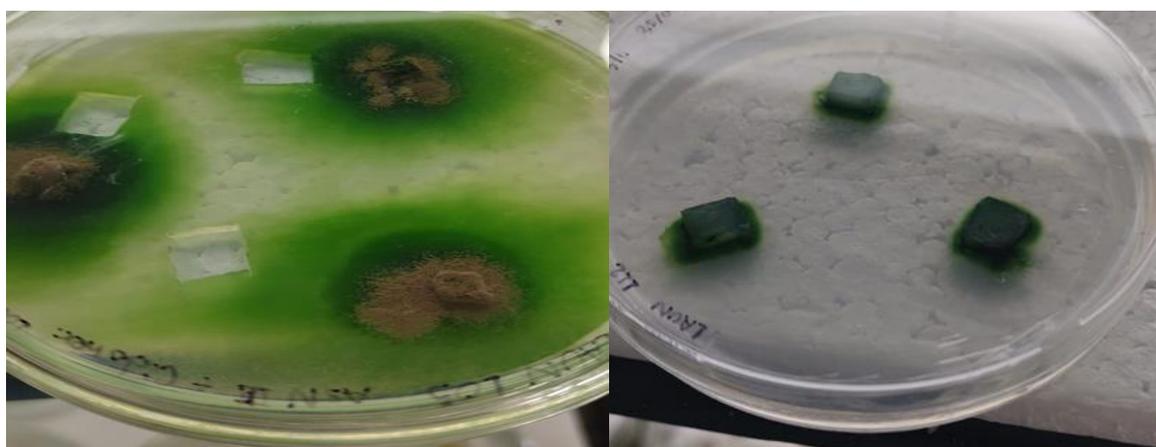


Figura 2-4 Aislamiento de cepas puras por técnica de cubo de agar invertido.

2.3.3 Identificación Morfológica de Especies

La identificación taxonómica de las especies aisladas se realizó mediante observación en un microscopio óptico Olympus CX31, aplicando las claves taxonómicas especializadas (Komárek y Anagnostidis, 2005; Komárek y otros, 2014).

2.3.4 Identificación molecular de las cepas

Se tomó de 0.2 g de biomasa fresca y se utilizó el kit Quick-gDNA TM 10 MiniPrep (ZYMO Research Corp, Irvine, Estados Unidos), siguiendo el protocolo establecido y con algunas modificaciones ajustadas de experimentos previos en el Laboratorio de Cultivo de Algas para la extracción de ADN genómico de las dos cepas aisladas y el consorcio (Cano, 2018; Peña, 2019).

Se utilizó como marcador el gen bacteriano 16S de la unidad pequeña del ribosoma. Para la amplificación se realizó con dos cebadores intermedios, el CYA 106F (CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA) y el CYA 781R, una combinación de los dos cebadores reverse CYA 781 a y b (GACTAC(T/A)GGGGTATCTAATCCC(A/T)TT) y el CYA 359 (GGGGAAT(C/T)TTCCGCAATGGG) (Núbel y otros, 1997). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad laboratorios Inc., Hercules, CA, EE.UU.) en alícuotas de 20 µl que contenía 10 µl de PCR mix – 100 2X (Corpogen, Colombia), 1 µl de cebador F, 1 µl de cebador R (cada cebador a una concentración de 10 µM), 1 µl de ADN y agua grado biología molecular hasta un volumen final de 20 µl. Los perfiles de PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 53°C por 30 s y 72°C durante 45 s, y una extensión final a 72°C durante 6 minutos. Para purificar los productos de PCR se utilizó el kit Direct-Gel-Spin DNA Recovery (ABM Good, Canadá), a partir de las bandas en gel de agarosa. Tanto las PCR como los productos limpios fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% con TAE al 1%. La electroforesis se corrió por aproximadamente una hora con voltaje de 100 V. Finalmente, se observó el resultado en un documentador de geles (Gel Doc™ XR+, BioRad).

Los productos purificados de PCR se enviaron a la casa comercial SSigMOL (Instituto de Genética, Universidad Nacional, Colombia), para la respectiva secuenciación del gen ribosomal 16S. El número de bases de los amplicones fue en promedio de 675 pb. La secuenciación se ejecutó siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Por último, cabe resaltar que la secuencia se realizó por el método de Sanger utilizando el primer 106F. Las secuencias se editaron usando el programa Geneious 4.8.2. Las comparaciones de secuencias se llevaron a cabo utilizando las bases de datos BLAST del centro nacional de información biotecnológica (NCBI).

2.4 Resultados y Discusión

2.4.1 Aislamiento de Cepas y Mantenimiento

Se recolectaron en promedio 5 muestras por visita, para un total de 25 muestras (tabla 2.2). Del total de las muestras recolectada el 24% presento muerte 12 horas después del tiempo de colecta, se observó pérdida de color en el material recolectado. El 64% supero el tiempo de adaptación y acople a las condiciones del laboratorio, sin embargo, al ser muestras ambientales, se evidencio la presencia de otros microorganismos como algas, hongos y bacterias los cuales colonizaron los medios rápidamente, impidiendo el crecimiento de las cianobacterias y llevado posteriormente a muerte celular. El 12% de las muestras recolectadas, se adaptó con éxito a las condiciones de laboratorio.

Tabla 2-2 Recolección de muestras en la vía Lagos y Leticia - Tarapacá.

No.	Fecha	Localización	Medio de cultivo BG-11	Cepa unialgal
1	8-03-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Liquido	Muerto
2	8-03-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Solido	Muerto por Contaminación
3	8-03-2021	4°10'01.5"S 69°56'17.4"W	Solido	Muerto
4	8-03-2021	4°06'35.6"S 69°56'42.5"W	Solido	Muerto
5	8-03-2021	4°06'23.2"S 69°58'09.8"W	Sólido, Liquido	Cepa <i>Limnothrix cf vacuolifera</i>
6	3-05-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Sólido, Liquido	Muerto por Contaminación
7	3-05-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Liquido	Muerto
8	3-05-2021	4°10'01.5"S 69°56'17.4"W	Liquido	Muerto por contaminación
9	3-05-2021	4°06'35.6"S 69°56'42.5"W	Sólido, Liquido	Cepa <i>Limnothrix sp.</i>
10	3-05-2021	4°06'23.2"S 69°58'09.8"W	Sólido, Liquido	Muerto por Contaminación

11	7-06-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Sólido, Líquido	Muerto por Contaminación
12	7-06-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Sólido, Líquido	Muerto por Contaminación
13	7-06-2021	4°10'01.5"S 69°56'17.4"W	Sólido, Líquido	Muerto por Contaminación
14	7-06-2021	4°06'35.6"S 69°56'42.5"W	Sólido	Muerto
15	7-06-2021	4°06'23.2"S 69°58'09.8"W	Líquido	Muerto por Contaminación
16	5-07-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Líquido	Muerto por Contaminación
17	5-07-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Líquido	Muerto por Contaminación
18	5-07-2021	4°10'01.5"S 69°56'17.4"W	Líquido	Muerto por Contaminación
19	5-07-2021	4°06'35.6"S 69°56'42.5"W	Sólido	Muerto por contaminación
20	5-07-2021	4°06'23.2"S 69°58'09.8"W	Sólido	Muerto
21	2-08-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Líquido	Consortio
22	2-08-2021	4°11'17.7"S 69°56'41.2"W	Líquido	Muerto por contaminación
23	2-08-2021	4°10'01.5"S 69°56'17.4"W	Líquido	Muerto por Contaminación
24	2-08-2021	4°06'35.6"S 69°56'42.5"W	Líquido	Muerto por Contaminación
25	2-08-2021	4°06'23.2"S 69°58'09.8"W	Líquido	Muerto por Contaminación

La mayor proliferación de cianobacterias en cuerpos de agua y sus efectos adversos han generado un mayor interés por parte de investigadores de todo el mundo, resaltando la importancia de estos organismos dentro de un ecosistema, así como sus efectos nocivos dados a su rápida y elevada reproducción, las cuales han sido más frecuentes debido a cambios importante en el medio (Hallegraeff, 1993; Landsberg y Shumway, 1998; Pérez, 2003). En el presente trabajo se logró recolectar 25 muestras provenientes de ambientes naturales, de las cuales 6 tuvieron muerte prematura durante la primera fase, (fase de reposo), las 19 muestras restantes, fueron cultivadas en medio BG-11 sólido (técnica de cubo de agar invertido) y líquido (replique continuo) cada 6 días, debido al difícil control de las condiciones de asepsia dentro del espacio designado para realizar el cultivo, se logró el cultivo y obtención de biomasa de 3 muestras, Cepa 5, Cepa 9 y Cepa 21 (Tabla 2.2).

Las cianobacterias son organismos difíciles de cultivar en ambientes controlados, más aún, lograr cultivos axénicos y unialgales (González-Gil y otros, 1999), debido a que muchas crean asociaciones, entrelazado los filamentos embebidos en una matriz mucilaginosa constituida por mucopolisacáridos y proteínas dificultando su separación e incluso impidiéndoles crecer de manera independiente debido a las relaciones simbióticas establecidas entre dichas especies (Whitton y Potts, *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity Tie and Space.*, 2000).

Del total de las especies recolectadas, al menos el 40% correspondían a especies unicelulares como *Merismopedia sp* y *Chroococcus sp*, las cuales presentaron muerte celular a los pocos días de haberse sembrado en medio BG-11 sólido, mientras que las filamentosas tuvieron mayor éxito. Esto se debe a la gruesa cubierta que recubre los tricomas, siendo esta característica la que les confiere mayor tolerancia al cambio (García-Pichel y otros, 2001), mientras que las especies unicelulares se protegen y se mantienen unidas con una secreción extracelular de mucoproteínas la cual, aparentemente, es menos resistente a la desecación que la cubierta de las filamentosas, provocando que las especies unicelulares no puedan sobrevivir y/o separarse de las otras especies del cultivo (Pérez, 2003).

Otra posible explicación al bajo rendimiento obtenido en el aislamiento de las especies de cianobacterias es la simbiosis que puede existir entre algunas especies con varios organismos tales como bacterias, hongos, microalgas, otras cianobacterias, etc. cuya supervivencia y crecimiento exitoso dependen de la coexistencia de ambos en el medio y sus interacciones metabólicas. Lo cual dificulta su aislamiento individual, y aunque no es imposible, lograrlo consumiría mucho tiempo y el crecimiento y obtención de biomasa puede no ser exitoso (Núbel y otros, 1997; Whitton y Potts, 2000). Adicional, aunque los medios de cultivos proporcionan los nutrientes tales como nitrógeno, fosforo (macronutrientes), sales minerales (micronutrientes) y un pH adecuado, necesarias para el crecimiento de estos organismos, las condiciones ambientales a las que se encuentran sometidas son difíciles de replicar en el laboratorio (Forero, 2019).

Por último, esta investigación es un trabajo pionero en la región frente al cultivo de estos microorganismos, por lo cual, la sede Amazonia y el laboratorio iban asumiendo el reto, por tal motivo, mientras se iban creando las condiciones apropiadas para realizar cultivos *in vitro*, la muerte celular fue recurrente.

2.4.2 Identificación morfológica de especies

Se logró con éxito aislar y cultivar las cepas 5 y 9 correspondientes al género *Limnothrix* (*Limnothrix sp.*, y *Limnothrix cf vacuolifera*). En la cepa 21 se cultivó *In vitro* el consorcio *Oscillatoria sp.* y *Lyngbya sp.* A continuación, se presentan las características morfológicas según las claves taxonómicas de Komárek y Anagnostidis (2005):

Cepa 5: *Limnothrix cf vacuolifera*

Dominio:	Prokaryota
Reino:	Eubacteria
Subkingdom:	Negibacteria
División:	Cyanobacteria
Clase:	Cyanophyceae
Subclase:	Synechococcophycidae
Orden:	Synechococcales
Familia:	Pseudanabaenaceae
Género:	<i>Limnothrix</i>
Especie:	<i>Limnothrix cf vacuolifera</i> (Skuja) Komárek ex G. McGregor 2007

Las cianobacterias de este género presentan filamentos solitarios, flotantes, ± rectos, largos. Vainas finas, incoloras, firmes y lisas, superpuestas a los extremos del tricoma. Tricomas poco o muy leve e indistintamente constreñidos en las paredes transversales, no atenuados hacia los extremos, de 1,3-2 µm de ancho. Células claramente más largas que anchas, (5-23 µm de largo), verde amarillento o azul verdoso, contenido celular homogéneo o con pocos gránulos pequeños dispersos, aerótopos en las paredes transversales. Células apicales redondeadas, sin caliptra ni pared celular engrosada.

Presencia: se han reportado en lagos de agua dulce de las regiones septentrionales de la zona templada y en las áreas subárticas, identificadas hacia el norte de Europa (Escandinavia) y de Canadá. Otras localidades necesitan revisión (figuras 2.5).



Figura 2-5 *Limnothrix vacuolifera* mediciones del filamento, cepa 9, 400x.

Cepa 9: *Limnothrix* sp.

Dominio:	Prokaryota
Reino:	Eubacteria
Subreino:	Negibacteria
División:	Cyanobacteria
Clase:	Cyanophyceae
Subclase:	Synechococcophycidae
Orden:	Synechococcales
Familia:	Pseudanabaenaceae

Género: *Limnothrix* sp.

Las cianobacterias de este género se caracterizan por presentar tricomas solitarios, isopolares, generalmente de vida libre, rectos, ligeramente curvados o flexuosos, que constan de numerosas células cilíndricas, principalmente alargadas, no contraídas o muy ligeramente contraídas en paredes transversales delgadas e indistintas, 1- 6 μm de ancho, no atenuados en los extremos, sin vainas hialinas finas, sin falsa ramificación, inmóviles. Todas las células con la misma morfología, más largas que anchas, tonalidad azul verdoso pálido, amarillento. Todas aptas o divisorias, con aerótopos apicales o centrales; tilacoides \pm dispuestos periféricamente.

Células apicales cilíndricas, redondeadas o aplanadas en los extremos, atenuadas de forma cónica, generalmente con uno o pocos aerótopos, sin caliptra, no capitada. - división celular perpendicular al eje largo. Reproducción por desintegración de tricomas en hormocitos inmóviles, sin células necríticas (figuras 2.6 y 2.7).



Figura 2-6 *Limnothrix* sp. mediciones del filamento, cepa 5, 400x.



Figura 2-7 *Limnothrix sp.* mediciones del filamento, cepa 5, 400x.

Consorcio 21: *Lyngbya sp.*- *Oscillatoria*

Dominio:	Prokaryota
Reino:	Eubacteria
Subreino:	Negibacteria
División:	Cyanobacteria
Clase:	Cyanophyceae
Subclase:	Oscillatoriophyceae
Orden:	Oscillatoriales
Familia:	Oscillatoriaceae
Género:	<i>Lyngbya</i> C. Agardh ex Gomont
Especie:	<i>Lyngbya sp.</i>

La especie de cianobacterias *Lyngbya sp.* se caracterizan por presentar filamentos rectos o ligeramente ondulados, son solitarios, principalmente formando esteras postradas delgadas, grandes, estratificadas, coriáceas sobre el sustrato, principalmente más ancho que largo de 6 μm . Los hormogonios y los tricomas rara vez abandonan la vaina. Unido al tricoma o ligeramente distante, firme, fino o espeso, incoloro o ligeramente amarillo-marrón. Contiene un tricoma móvil. Tricomas cilíndricos, no constreñidos en las paredes transversales. Células cortas, discoideas, siempre más anchas que largas, sin aerótopos. Células apicales generalmente con pared celular externa engrosada o con caliptra. Reproducción por desintegración de tricomas en hormogonios móviles cortos con ayuda de necridios (figura 2.8).

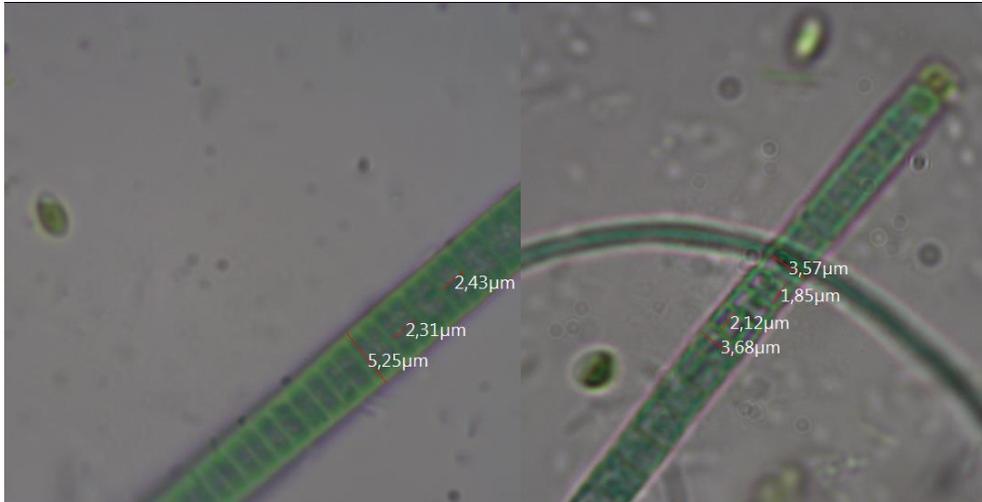


Figura 2-8 *Lyngbya sp.* mediciones del filamento, 1000x.

Dominio:	Prokaryota
Reino:	Eubacteria
Subkingdom:	Negibacteria
División:	Cyanobacteria
Clase:	Cyanophyceae
Subclase:	Oscillatoriophycidae
Orden:	Oscillatoriales
Familia:	Oscillatoriaceae
Género:	<i>Oscillatoria</i> Vaucher ex Gomont
Especie:	<i>Oscillatoria sp.</i>

La especie de cianobacterias *Oscillatoria sp.* posee filamentos isopolares, en esteras o estratos, a veces compactos y estratificados, tricomas solitarios. Vaina ausente, firmes, abiertas, que comprenden uno o más tricomas, sin falsa ramificación. Tricomas cilíndricos, rectos, no constreñidos, 6-35 (-8) µm de ancho, facultativamente móviles (deslizamiento, oscilación, rotación, temblor). Células discoideas, siempre más anchas que largas, con división celular rápida; aerótopos ausentes; células apicales en tricomas completamente desarrollados con pared celular externa engrosada o con caliptra. Los tilacoides son cortos, ondulados, más concentrados en las partes periféricas. Se produce de forma transversal, perpendicular al eje del tricoma, en una secuencia rápida, a veces

en zonas meristemáticas. Reproducción por desintegración (a veces completa) de tricomas en hormogonios móviles cortos u hormocitos inmóviles de las partes apicales de los tricomas o de todo el tricoma, dividiéndose con la ayuda de células necróticas. La mayoría de los géneros y especies aún no se han confirmados por métodos moleculares (figura 2.9).

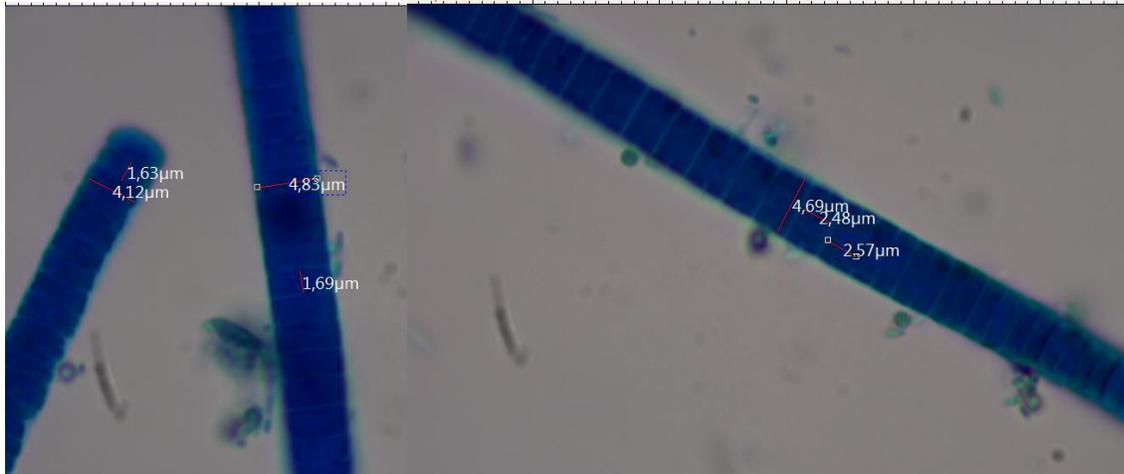


Figura 2-9 *Oscillatoria* sp. mediciones del filamento, 1000x.

Las investigaciones realizadas en aguas de la cuenca, debido a esto se han logrado identificar taxonómicamente 11 géneros de los cuales *Lyngbya* y *Oscillatoria* son las más recurrentes en las colectas (Tabla 2.3).

Tabla 2-3 Géneros de cianobacterias identificadas en cuerpos de agua de la Amazonia colombiana. Tomadas del libro: *Microalgas acuáticas. La otra escala de la biodiversidad en la Amazonia colombiana* (Núñez-Avellaneda y Marciales-Caro, 2008)

Genero	Especies
<i>Chroococcus</i>	<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing), <i>C. limneticus</i> , <i>C. cf. cumulatus</i> (Bachmann)
<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanocapsa af. elachista</i> (West), <i>A. cf. hialina</i> (Lyngbye)
<i>Merismopedia</i>	<i>Merismopedia maior</i> ((Smith) Geitler 1925), <i>M. glauca</i> ((Ehrenberg) Nägeli)
<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena constricta</i> ((Szafer) Geitler), <i>A. circinalis</i> (Rabenhorst)
<i>Lyngbya</i>	<i>Lyngbya af. perelegans</i> (Lemmermann), <i>L. martensiana</i>

<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria chlorina</i> (Kützing), <i>O. splendida</i> (Greville ex Gomont), <i>O. af. geminata</i> (Meneghini), <i>O. cf. pseudogeminata</i> (Schmid), <i>O. sancta</i> (Kützing), <i>O. af. gattulata</i> (Van Goor)
<i>Spirulina</i>	<i>Spirulina cf. laxa</i> (Smith)
<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>
<i>Hapalosiphonn</i>	<i>Hapalosiphonn sp.</i>
<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aff. smithii</i> ; <i>Microcystis aff. wesenbergii</i>

2.4.3 Identificación Molecular

De las cepas aisladas y cultivadas *In vitro* se logró identificar dos cepas por comparación de secuencias amplificadas en las bases de datos BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), ambas del género *Limnothrix*; la cepa 5 como *Limnothrix sp.* (tabla 2.4) y la cepa 9 como *Limnothrix planktonica* (tabla 2.5). No se logró secuenciar las cianobacterias correspondientes al consorcio, debido a mezcla de ADN durante del proceso de extracción y purificación del material a amplificar.

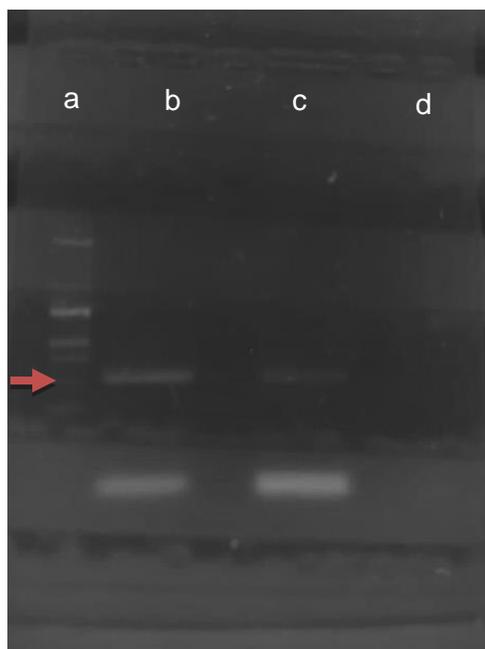


Figura 2-10 Productos de PCR gen 16s. a) Escalera, b) cepa 5, c) cepa 9, d) control negativo. Gel de agarosa 1.5%.

Los resultados de la secuenciación del gen de la subunidad 16s del rRNA fueron:

Cepa 5:

```
CGTGAGGGACGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCTG
ACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACG
GAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTCG
TAAGTCTGTCTTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAAACTGTGAGA
CTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TTGGGAAGAACACCAGCAGCGAAGGCGTTCTACTGGACCAAACCTGA
```

Los resultados de la comparación de secuencias con la base de datos BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) arrojó:

Tabla 2-4 Comparación secuencia de la amplificación de la cepa 5 en la base de datos BLAST.

Accesión	Nombre	Query	Porcentaje de	Autor
----------	--------	-------	---------------	-------

		Cover	Identidad	
EF088336.1	<i>Limnothrix sp</i>	100%	99.70%	(Furtado y otros, 2009)
GU368112.2	<i>Limnothrix sp</i>	100%	99.70%	(Magana-Arachchi y otros, 2011)
KF246506.1	<i>Limnothrix sp.</i>	100%	99.70%	(Andreote y otros, 2014)
MT135017.1	<i>Limnothrix sp</i>	100%	99.70%	(Ji, 2021)
MN551904.1	<i>Limnothrix sp</i>	100%	99.70%	(Shishido y otros, 2020)
MT497349.1	<i>Limnothrix sp</i>	100%	99.70%	(Ballesteros y otros, 2021)

Cepa 9:

CGTCAGGTTTGGTCCAGTAGAACGCCTTCGCTGCTGGTGTTCCTCCCAATATCTACG
 CATTTCACCGCTACACTGGGAATTCCTTCTACCCCTACCTACCTCTAGTCTCGCAGTT
 TCCATCCCCTTTATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTAAAGACAGACTTACGAGACCGCC
 TGCGGACGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTCTTACCGC
 GGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTGATTCCTCAGGTACCGTCAGATCTTCTTC
 CCTGAGAAAAGAGGTTTACAACCCACAGGCCTT

Los resultados de la comparación de secuencias con la base de datos BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) arrojó.

Tabla 2-5 Comparación secuencia de la amplificación de la cepa 9 en la base de datos BLAST.

Accesión	Nombre	Query Cover	% Identidad	Autor
JQ004026.2	<i>Limnothrix planktonica</i>	100%	100%	(Zhu y otros, 2012)
MF629814.1	<i>Limnothrix cf planktonica</i>	100%	100%	(Cunha de Oliveira y otros, 2019)
KP726240.1	<i>Limnothrix planktonica</i>	100%	100%	(Kaplan-Levy y otros, 2016)
KR095583.2	<i>Limnothrix planktonica</i>	100%	100%	(Xianglinig y otros, 2015)
KU321244.1	<i>Limnothrix planktonica</i>	100%	100%	(Akagha y otros, 2019)

Las cianobacterias actualmente son reconocidas por ser una buena fuente de productos nuevos, y diversos, pero para poder llegar a explotar dicho potencial es necesario conocer su diversidad, riqueza y distribución la cual ha sido poco estudiada en especial en regiones tropicales del continente (Grewe y Pulz, 2021).

Los géneros y especies de cianobacterias identificadas en esta región han sido descritas mediante el uso de claves taxonómicas (Cunha de Oliveira y otros, 2019). Sin embargo, en la actualidad se reconoce que los datos basados en la morfología no son suficientes para la adecuada identificación de taxones de cianobacterias (Komárek, 2016) debido a que los organismos de estudio, aunque poseen el mismo material genético, presentan modificaciones morfológicas con base al hábitat, clima, e incluso a organismos con los que se encuentra en interacción, este mismo suceso se presenta cuando son cultivadas en condiciones de laboratorio (Pineda-Mendoza y otros, 2011) esto conlleva a errores de observación y la identificación. Por ello, es necesario apoyar el sistema tradicional, con un enfoque polifásico (Sciuto y otros, 2012). Este enfoque consiste en combinar los datos derivados de la secuenciación molecular a partir de marcadores moleculares altamente conservados y difícilmente modificables por elementos externo, y el análisis filogenético con los obtenidos mediante otros métodos tales como, los análisis morfológicos, ecológicos y fisiológicos (Komárek, 2016) permitiendo obtener un trabajo robusto en el que se disminuye las posibilidades de errores al momento de identificar cianobacterias.

A nivel molecular se identificó la cepa 5 *Limnothrix sp.* morfológicamente identificada como *Limnothrix cf vacuolifera*, presentó un 99,70% de identidad y la cepa 9 *Limnothrix*

planktonica morfológicamente identificada como *Limnothrix sp.* presentó un 100% de identidad. Del consorcio no se logró obtener identificación alguna, debido al cruce de material genético correspondiente a ambos organismos.

Realizado el empalme de la secuencia y comparándola con secuencias de las bases de datos BLAST (NCBI) las cepas presentaron un porcentaje de identidad superior al 99.7%.

Limnothrix sp., es una cianobacteria objeto de estudio debido a sus contribuciones ecológicas, y por la flexibilidad adaptativa y de asociación. Se puede encontrar en sistemas eutrofizados marinos y de agua dulces, en constante asociación con otras cianobacterias como *Oscillatoria* y *Plantothrix*. (Komárek y Anagnostidis, 2005). Realizado el empalme con las bases de datos de Blast, se identificó una amplia distribución de este espécimen, desde China, Nigeria, Ecuador y Brasil, en ecosistemas marinos y dulces, tal como se corrobora con la descripción taxonómica (Komárek y otros, 2014).

La cianobacterias *Limnothrix planktonica*, fue identificada por primera vez para la Amazonia Brasileira por Cunha de Oliveira y otros (2019), en la Amazonia Colombiana es el primer registro molecular.

2.5 Conclusiones

Las cianobacterias filamentosas fueron las que se adaptaron con mayor facilidad a las condiciones controladas de laboratorio, logrando obtener biomasa para los estudios posteriores.

La identificación molecular y taxonómica permitió identificar las cepas 5 y 9 cultivadas *In vitro*, la cepa cinco corresponde a *Limnothrix sp.* y la nueve a *Limnothrix planktonica*, en un porcentaje de identidad superior al 99.7%.

Molecularmente, el género *Limnothrix sp.* y la especie *Limnothrix planktonica* se registran por primera vez para la Amazonia Colombiana.

El género *Limnothrix sp.* se puede encontrar en asociaciones con cianobacterias de los géneros *Oscillatoria* y *Plantothrix*.

3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DOS CEPAS DE *Limnospira* Y CONSORCIO *Oscillatoria* Y *Lyngbya* DE LA AMAZONIA COLOMBIANA

3.1 Resumen

Se aislaron dos cepas del género *Limnospira* sp. (*Limnospira vacuolifera* cepa 5 y *Limnospira planktonica* cepa 9) y un consorcio *Oscillatoria* – *Lyngbya* y se obtuvieron extractos polares y no polares a partir de la biomasa asociada a las cepas 5, 9 y el consorcio. Los extractos polares presentaron resultados positivos inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*) y una especie de hongo (*Penicillium*) cultivados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. De igual manera se logró identificar la presencia de genes asociados a metabolitos secundarios, correspondientes a los dominios KS de policétidos (a) y dominio A de los péptidos no ribosomales. Con respecto al consorcio las pruebas moleculares para la detección de metabolitos no fueron positivas, debido al entrecruzamiento de material genético.

3.2 Introducción

Las cianobacterias han existido desde hace aproximadamente 3,500 millones de años y resultado de su historia evolutiva presentan una gran riqueza morfológica, genética y química (Al-Haj y otros, 2016; Peña, 2019). La diversidad química probablemente refleja su larga evolución y su adaptación a diversos ecosistemas, condiciones de crecimiento y competidores o depredadores (Rastogi y Sinha, 2009; Méjean y Ploux, 2013).

Durante décadas, las investigaciones en cianobacterias se centraron en el estudio de su ecología, morfología, fisiología y su filogenia basada en la unidad ribosomal 16S rRNA (Abed y otros, 2009). Sin embargo, en las últimas décadas los estudios realizados se encuentran enfocados al descubrimiento de sustancias con potencial biotecnológico, descubriendo en menos de 40 años más de 800 metabolitos diferentes, útiles en biomedicina, agropecuaria, cosmética y en investigaciones básicas (Colla y otros, 2007; Sekar y Chandramohan, 2008). Entre los metabolitos de interés que se han encontrado

en cianobacterias están Spirulán calcio (*Arthrospira platensis*) un fuerte inhibidor de la actividad reverso-transcriptasa del VIH, Nostoflan (*Nostoc flagilliforme*) antiviral probado desde el papiloma hasta la gripe, sulfoglicolípidos libres de fósforo (*Scytonema sp.*) antiviral inhibidor de la ADN polimerasa, las criptoficinas (*Nostoc sp.*) efecto anticancerígeno, la dolastatina 15 (*Lyngbya sp.*) tratamiento del cáncer, entre otros (Maderna y otros, 2014; Lopiz, 2016)

Las funciones de los metabolitos secundarios en sus células son desconocidas, pero se cree que la producción de un metabolito específico genera ventajas al productor frente a un ecosistema complejo y competitivo (van Apeldoorn y otros, 2007). Algunos de los metabolitos secundarios de las cianobacterias son tóxicos para animales y humanos, por lo que a este tipo de metabolitos se les conoce como cianotoxinas (Méjean y Ploux, 2013).

Según la vía metabólica se pueden clasificar de acuerdo con el metabolito utilizado para su síntesis, de esta manera se puede encontrar alcaloides, terpenos, péptidos no ribosomales, policétidos o híbridos entre estos, o moléculas mucho más grandes como péptidos ribosomales y polisacáridos (Del Cerro, 2015).

Los metabolitos a estudiar en el presente trabajo son los policétidos, sintetizados por las llamadas policétido sintetasas (PKSs, por sus siglas en inglés) y los péptidos no ribosomales, sintetizados a su vez por sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs, por sus siglas en inglés) (Del Cerro, 2015). Estos dos tipos de metabolitos al igual que los compuestos híbridos de estas dos vías biosintéticas son los producidos mayoritariamente por cianobacterias (Tan, 2007). Estos últimos, los productos mixtos entre las rutas biosintéticas de los NRPs y los PKs) son los más importantes en el descubrimiento de nuevos compuestos (Bayona, 2014; Cano, 2018; Peña, 2019).

Los metabolitos secundarios producidos por este tipo de enzimas se sintetizan de forma modular consiguiendo alcanzar una diversidad y gran complejidad estructural que los hace muy interesantes a la hora de estudiar nuevas moléculas con potencial actividad farmacológica (Rastogi y Sinha, 2009). Muchos de estos compuestos combinan características estructurales de péptidos con secciones de lípidos y luego se vuelven más funcionales con modificaciones químicas (Gutiérrez y otros, 2010). Entre las más comunes, se encuentran la metilación, dimetilación, la incorporación de anillos heterocíclicos, la extensión de la cadena alifática y las hidroxilaciones (Tan, 2007). Es por esta razón, que estos metabolitos son muy diversos en la naturaleza y representan un porcentaje alto de compuestos aislados en cianobacterias (Cano, 2018; Peña, 2019).

Los metabolitos en cianobacterias han sido ampliamente estudiados con fines de encontrar compuestos útiles para el hombre. *Nostoc sp.* es una de la cianobacterias que más ha despertado el interés de investigadores debido a que contiene criptoficina, un compuesto que inhibe el crecimiento de células cancerosas (D'Agostino y otros, 2006). Así mismo se ha descubierto la presencia de metabolitos secundarios que actúan como

agentes con potencial antiprotozoario y antituberculoso (Broniatowska y otros, 2011), e incluso se informó de un efecto reductor de colesterol en roedores, atribuido al alto contenido de fibra que posee (Hori y otros, 1994; Rasmussen y otros, 2009).

Los metabolitos cianobacterianos han demostrado en el campo de la medicina una acción de tipo inhibitoria sobre ciertas enzimas (Chen y otros, 2007; Zelík y otros, 2009) como lo son las microcistinas una cianotoxinas que tienen un efecto anti-fosfatasa y las anatoxinas (S) que son anticolinesterasa (van Apeldoorn y otros, 2007). Los compuestos que tienen acción antiacetilcolinesterasa juegan un papel muy importante en la búsqueda de posibles candidatos a fármacos contra la enfermedad de Alzheimer (Francis y otros, 1999; Trevisan y otros, 2003; Carvalho y otros, 2013).

En el ámbito de la agricultura, la cianobacterias, actúan como un sensor en la productividad del suelo (Sharma y otros, 2011). Ayudan a regular procesos como mantener la estabilidad estructural, acelerar la colonización y la diversificación de nichos en superficies desnudas, mejorar el carbono orgánico, liberar ácidos carbónicos en el sitio de colonización y mejorar el suelo agregando nitrógeno y fósforo (Whitton, 2012).

En especial, las cianobacterias filamentosas desempeñan múltiples funciones en la mejora de la fertilidad del suelo y, por lo tanto, en la mejora de las plantas de cultivo (Mehboob, Lucas, y Shahida, 2014). En la rizósfera, las cianobacterias interactúan directamente con las plantas a través de una variedad de metabolitos secundarios. Las fitohormonas, como las auxinas, son utilizadas comúnmente por los microorganismos rizosféricos para interactuar con las plantas (Spaepen, Vanderleyden, y Remans, 2007).

Diversos estudios han concluido que las cianobacterias, las cuales poseen potenciales de acondicionamiento de suelos y conservación del ambiente, podrían ser de los candidatos más apropiados en el desarrollo de prácticas sustentables en agricultura y con ello la minimización de la dependencia de fertilizantes químicos (Kishore y Bimal, 2010; Corrales y otros, 2017)

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Producción de Biomasa en Laboratorio

Se utilizó las cepas 5 (*Limnotrix* sp.), 9 (*Limnotrix planktonica*) y el consorcio *Oscillatoria* y *Lyngbya*. La biomasa necesaria se obtuvo a partir de cepas de cianobacterias aisladas y cultivadas *In vitro* en el Laboratorio de Gestión de Humedales de la Sede Amazonia de la Universidad Nacional de Colombia, según la metodología descrita en el capítulo 2 de este documento. Las condiciones de cultivo fueron en Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio nutritivo BG-11, fotoperiodo 12:12

luz/oscuridad y 25° C +/- 2° C. Aireación del ambiente con bomba de aire. La biomasa se recolectó después de 3 meses de cultivo.

3.3.2 Preparación de Extractos

Se recuperó la biomasa de interés mediante remoción del material biológico y depositado en tubos falcon de 25 ml. Cada muestra fue liofilizada y pesada. El material obtenido dependiendo del peso final en seco, fue dividido en dos partes iguales, las cuales fueron sometidas a procesos de extracción de metabolitos polares y no polares.

Para los extractos polares se utilizó como solvente metanol (10ml) y para extractos no polares se usó hexano (10ml). Este proceso se realizó por triplicado para cada una de las cepas. Los extractos fueron concentrados mediante el uso de un Reacti-Vap™ Evaporator TS18825 (Thermo Scientific), y el sólido resultante fue resuspendido en DMSO. Cada uno de los extractos se llevó a una concentración final de 10 mg/ml.

3.3.3 Pruebas antimicóticas y antibacterianas

Las pruebas de inhibición se realizaron por la técnica de pozuelos, se dispuso de 3 cepas bacterianas, una Gram positivas (*Enterococcus faecalis*) y dos Gram negativa (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y una cepa fúngica (*Penicillium*) cultivadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá en medio PDA (potato dextrose agar) para hongos y Agar Müller Hinton para las bacterias (Tabla 3,1).

Una vez inoculadas las cajas de Petri con los microorganismos, se realizaron pozuelos con un sacabocados y en él se agregó 1 µl de extracto. Para el análisis antibacteriano se realizó seguimiento cada hora durante 24 horas y para el análisis antifúngico se realizó seguimiento a partir de las 72 horas de inoculado el medio.

Tabla 3-1 Organismos certificados para pruebas microbianas.

Especie	Característica	Medio de cultivo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria gran +	Agar Müller Hinton
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria gran -	Agar Müller Hinton
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacteria gran -	Agar Müller Hinton
<i>Penicillium</i>	Hongo	PDA

3.3.4 Identificación de PKs y NRPs

Se utilizaron dos pares de primers específicos para la amplificación de genes de los NRPS y PKS (Tabla 3-2). Estos cebadores apuntan directamente a los dominios de adenilación (A) y cetosintasa (KS), respectivamente. El ADN de una cepa de *Microcystis aeruginosa* de la colección LEGE del CIIMAR (Portugal) se utilizó como control positivo para la presencia de los genes de los dominios de los NRPSs y PKSs. Los ciclos de PCR consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C; 30 s a 54°C para NRPS, y 44°C para PKS, seguido de 1 min a 72°C. Por último, se realizó una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Todas las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad laboratorios Inc., Hercules, CA, EE. UU.) en volúmenes totales de 20 µl que contenían 10 µl de Kit PCR-100-2X (Corpogen, Colombia), 1 µl del primer reverse, 1 µl de primer forward, 0,5 µl de ADN y agua de biología molecular hasta un volumen final de 20 µl. Los amplicones de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen, EE. UU.) para verificar el tamaño del fragmento amplificado.

Tabla 3-2 Primers usados para la amplificación de los genes 16S y de los péptidos no ribosomales (NRPS) y Policétidos (PKS). En el primers 786R se usó una mezcla de las dos variables del primer.

Nombre del cebador	Secuencia	Gen objetivo	Referencia
106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	16S rRNA	(Núbel y otros, 1997)
186R	GACTAC(T/A)GGGGTATCTAATCCC(A/T)TT		
DKF	GTGCCGGTNCRTGNGYYTC	Dominio	(Moffitt y Neilan, 2001)
DKR	GCGATGGAYCCNCARCARMG	KS de los PKS	
MTF2	GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC	Dominio de	(Nelán y otros, 1999)
MTR	CCNCGDATYTTNACYTG	A de los NRPS	

3.4 Resultados

3.4.1 Pruebas antimicrobianas

Se obtuvo un total de 6 extractos para la realización de las pruebas inhibitorias antimicrobianas y antifúngicas. 3 extractos polares y 3 extractos no polares en base a la biomasa obtenida correspondiente a las cepas 5, 9 y consorcio, los cuales arrojaron resultados positivos contra bacterias.

Limnothrix cf vacuolifera

El extracto polar correspondiente a la cepa 5 (*Limnothrix sp.* morfológicamente identificada como *Limnothrix cf vacuolifera*) presentó actividad inhibitoria para las bacterias cultivadas. Presentó mayor inhibición frente a la bacteria Gram negativa *E. faecalis* con halo mayor a 0,5 cm. Y se consideran positivos los resultados respecto a los microorganismos *E. coli* y *Klebsiella* debido a que, aunque el halo fue inferior a 0,5 cm la duración fue mayor a las 32 horas después de la siembra (figura 3.1; Tabla 3-3).

Las pruebas respecto al extracto no polar fueron negativas para todas las cepas sembradas. La prueba antifúngica presentó un resultado negativo, la cepa de *Penicillium* se dispersó por todo el medio y no se observó inhibición (Figuras 3.2 y 3.3).

Tabla 3-3 Resultados pruebas de inhibición de crecimiento microbianos por difusión de disco para cepa 5.

Especie	Extracto polar	Extracto no polar
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-
<i>Penicillium</i>	-	-



Figura 3-1 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio.

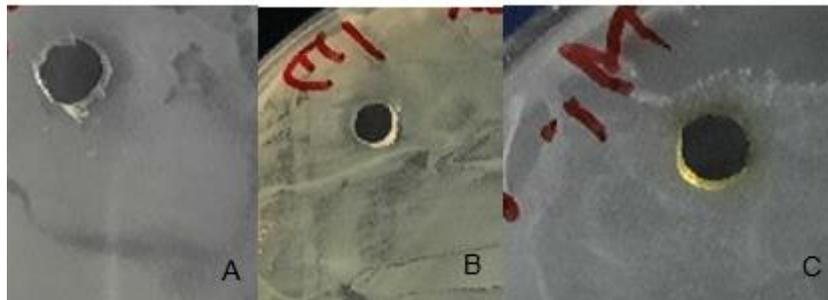


Figura 3-2 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos no polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio

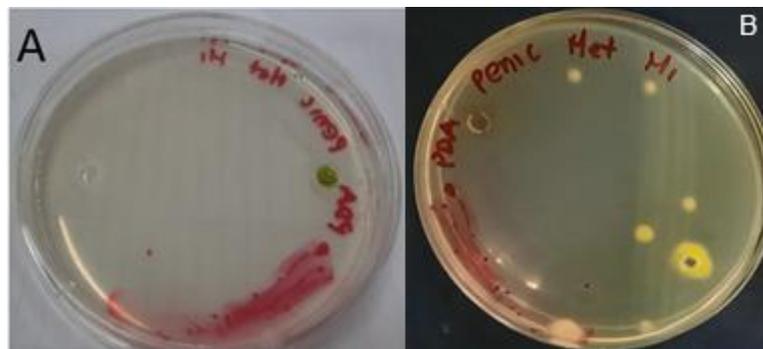


Figura 3-3 A) Inoculación de *Penicillium* a un extremo y el extracto al otro. B) crecimiento del hongo 72 horas después de la inoculación.

Limnothrix planktonica

Los extractos correspondientes a la cepa 9 (*Limnothrix planktonica* morfológicamente identificada como *Limnothrix* sp.) presentaron actividad inhibitoria de extractos polares respectos a bacterias sembradas, en promedio el halo de inhibición fue de 0,6 cm y se

mantuvo 32 horas después de la inoculación. No se presentaron resultados positivos respecto los extractos no polares (figuras 3.4 y 3.5; Tabla 3.4)

El hongo pasadas las 72 horas no presentó crecimiento significativo en el medio, creció únicamente alrededor del área de inoculación, por lo que se considera un resultado positivo (figura 3.6), para el extracto polar.

Tabla 3-4 Resultados pruebas de inhibición de crecimiento microbianos por difusión de disco para cepa 9

Especie	Extracto polar	Extracto no polar
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-
<i>Penicillium</i>	+	-



Figura 3-4 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio.

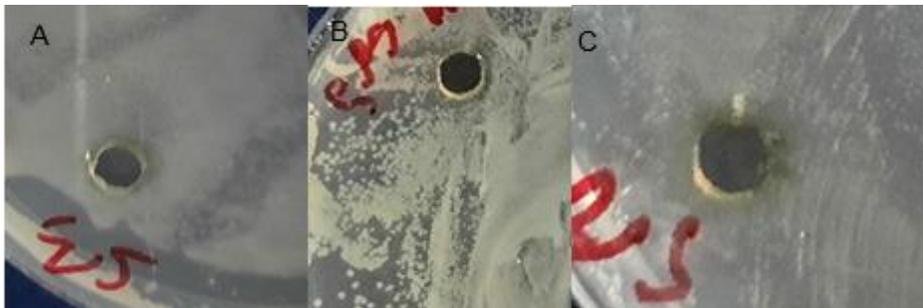


Figura 3-5 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos no polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio.

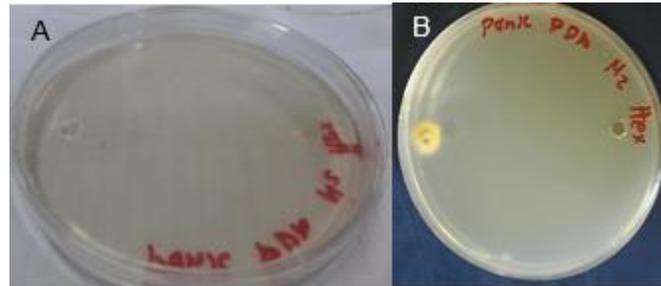


Figura 3-6 A) Inoculación de *Penicillium* a un extremo y el extracto al otro. **B)** crecimiento del hongo 72 horas después de la inoculación.

Consorcio *Oscillatoria* sp. y *Lyngbya* sp.

El consorcio, frente a la bacteria *E. coli* presentó el mayor halo de inhibición superando el cm de diámetro y manteniéndose por un tiempo superior a 32 horas (figura 3.7) con el extracto polar. Respecto a la actividad antifúngica y antimicrobiana de los otros organismos no hubo una actividad inhibitoria y los microorganismos crecieron exponencial en la caja de Petri (Figura 3.8; Tabla 3.5).

Tabla 3-5 Resultados pruebas de inhibición de crecimiento microbianos por difusión de disco para consorcio

Especie	Extracto polar	Extracto no polar
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Penicillium</i>	-	-

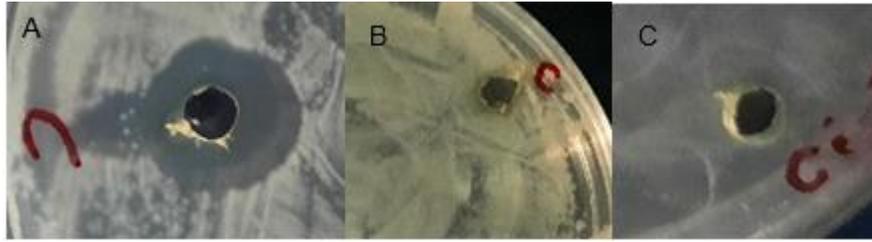


Figura 3-7 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio.



Figura 3-8 Prueba de inhibición de crecimiento con extractos no polares A) *E. coli* B) *Klebsiella* C) *E. faecalis*. Después de las primeras 24 horas de inoculado el medio.

3.4.2 Presencia de PKs y NRPs

Se dispuso de dos cepas puras y un consorcio con el fin de detectar la presencia de genes productores de metabolitos secundarios (NRPS y PKS). El dominio KS (Cetosintasa) presente en las enzimas productoras de PKS se amplificó en 2 de 3 de las muestras (cepas unialgales 5: *Limnothrix vacuolifera* y 9: *Limnothrix planktonica*). En cuanto al dominio de adenilación (A) de los NRPS fue amplificado el 100% de las cepas (tabla 3.6), Se realizó la amplificación de un control positivo (*Microcystis aeruginosa*) y un control negativo (sin ADN; figura 3.9).

Tabla 3-6 Resultados presencia de genes PKs y NRPs.

	PKSs	NRPSs
Cepa 5 <i>Limnothrix cf vacuolifera</i>	+	+
Cepa 9 <i>Limnothrix planktonica</i>	+	+
Consorcio	-	+



Figura 3-9 Amplificaciones de (a) los dominios KS de policétidos y (b) los dominios A de los péptidos no ribosomales. Gel de PCR, 1) Marcador de peso molecular, 2) vacío, 3) Cepa 5, 4) Cepa 9, 5) Consorcio, 6) vacío 7) Control negativo 8) Control positivo *Microcystis aeruginosa*. El fragmento del gen dominio KS es aproximadamente 600 pb y el del dominio A es de 1000 pb.

3.5 Discusión

Los resultados observados en las pruebas de inhibición fueron positivos para extractos polares, y la inhibición del hongo *Penicillium* por la cepa 9. De igual forma la presencia de genes asociados a metabolitos secundarios.

La presencia del dominio KS correspondiente a policétidos y el dominio A correspondiente a péptidos no ribosomales se detectó en el 100% de las cepas. Estos resultados son acordes a trabajos realizados anteriormente en cianobacterias filamentosas, sin embargo, se resalta que la presencia de PKS es mayor en comparación a NRPS, debido a ello, es necesario realizar estudios en más especies de cianobacterias para corroborar y ampliar la información (Christiansen y otros, 2001; Brito y otros, 2015; El Samak y

otros, 2018). La presencia de genes en las cepas indica potencial biotecnológico, acorde a los resultados de las pruebas antimicrobianas y antifúngicas (El Samak y otros, 2018).

Las cianobacterias pertenecientes a los géneros *Limnothrix*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Spirulina*, *Arthrospira*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Synechocystis*, y *Synechococcus*, entre otras han sido ampliamente estudiadas, debido a la elevada producción de bioactivos (Thajuddin y Subramanian, 2005), de los cuales se destaca, el uso como complemento alimenticio (Grewe y Pulz, 2012), biofertilizantes (Irisarri y otros, 2001) y biorremediadores de ambientes eutrofizados (Ruangsomboon y otros, 2013), indicadoras de contaminación orgánica (Peinador, 1999), productoras de una amplia variedad de compuestos bioactivos con posible interés farmacéutico (Abed y otros, 2009; Rastogi y Sinha, 2009), exopolisacáridos (Vicente y otros, 2004), y energía en forma de hidrógeno (Min y Sherman, 2010).

El género *Limnothrix* sp. se puede encontrar comúnmente en cuerpos de agua eutrofizados (marinos y de agua dulce), asociadas a cianobacterias del género *Oscillatoria* y *Plantothrix agardii* (Komárek y Anagnostidis, 1989). Son organismos halotolerantes lo que les confiere habilidad para una mayor adaptación a ambientes con diferentes porcentajes de salinidad (Berland y otros, 1989), siendo los de menos salinidad los más adecuados para la producción de pigmentos como ficocianinas, lípidos, carbohidratos, carotenos y exopolisacáridos (Lemus y otros, 2013)

En Colombia, las investigaciones realizadas respecto cianobacterias son limitadas, y estudios en biotecnología y bioprospección son aún más escasos. Aun así, se han realizado avances en la identificación molecular y filogenia de cianobacterias marinas, además del potencial para la producción. Cano (2018) encontró que, de 25 cepas de cianobacterias marinas aisladas solo una cepa, *Leptolyngbya* sp, presenta actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, 11 cepas inhiben el crecimiento de *E. coli* y la mayoría presentan actividad antifúngica. Por otro parte, Ayala (2017) halló que los géneros *Lyngbya*, *Moorea*, *Phormidium* y *Symploca* asociados en consorcios son positivos como larvicidas, priorizando al consorcio del género *Moorea*, donde se observó una mortalidad del 100% en las larvas del mosquito *Aedes aegypti*. Este resultado es de suma importancia, debido a que son reportes pioneros para cianobacterias extraídas de Islas del Rosario.

Becerra (2017) encontró que dos consorcios de cianobacterias marinas son positivos contra *Artemia salina*, es decir, son efectivos herbicidas, sin embargo, no se aclara que especies o géneros de cianoabcterias están presentes en esos consorcios; por otra parte, Prato (2013) encontró la misma actividad herbicida en 7 extractos de cianobacterias de los géneros *Lyngbya* y *Oscillatoria* recolectados en Islas del Rosario. De los trabajos mencionados dos han presentado resultados positivos contra líneas cancerígenas demostrando la efectividad de las cepas marinas como agentes citotóxicos; en Cano (2018) se obtuvo una efectividad citotóxica del 100% en todas las líneas cancerígenas probadas, mientras que en Bayona (2014) se encontró porcentajes de

crecimiento menores al 25% en cultivos mamarios cancerígenos, en 9 de las 19 cepas de extractos de cianoabcterias evaluadas. Por último, Peña (2019) identifico la presencia de los dominios KS de las PKSs en el 100% de las cepas cultivadas, y en filamentosas la presencia del dominio A para las NRPSs, lo que indicaría una posible producción de metabolitos secundarios con componentes bioactivos.

En agua dulce, Galeano y Villalobos (2011) identificaron cianobacterias y detectaron la presencia de microcistinas en el antiguo delta del río Sinú, en el departamento de Córdoba; también Forero (2019) investigó la presencia de cianotoxinas en el embalse La Regadera, determinando la presencia de la especie *Aphanizomenon cf. gracile*, que constituye una especie potencialmente tóxica productora de la saxitoxina (SXT). Además de la presencia de los géneros *Lyngbya sp.*, *Phormidium sp.* y *Leptolyngbya sp.*, los cuales se han reportado como microorganismos potencialmente productores de las cianotoxinas saxitoxina (STX) y microcistina (MCs), siendo también la población que más prolifera en el embalse.

La actividad antibiótica que se encontró en las dos cepas de *Limnothrix* es la primera registrada para Colombia de cianobacterias continentales, mostrando el potencial que se puede encontrar en estos organismos en una época donde incrementan las bacterias resistentes a antibióticos tradicionales. La mayoría de las investigaciones se centran en antivirales y anticancerígenos, por eso se han caracterizado pocos metabolitos con actividad antibiótica provenientes de cianobacterias, entre esos están *nascomina* (*Nostoc commune*), el diterpenoide norbietano (*Microcoleus lacustris*), el compuesto aromático policlorado ambigol C (*Fischerella ambigua*), compuestos fenólicos (*Nostoc muscorum*), y un número alto de cianotoxinas (Lopez, 2016)

3.6 Conclusiones

Los ensayos de inhibición arrojaron resultados positivos respecto a bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y el hongo *Penicillium*, especialmente los extractos polares, lo que indica la presencia de metabolitos con potencial antimicrobiano.

La amplificación de genes asociados a metabolitos secundarios respecto a los dominios KS correspondientes a policétidos y el domino A correspondiente a péptidos no ribosomales, fueron positivos en un 100%, resultados acorde a los ensayos de inhibición antimicrobiana realizados.

Identificar a nivel molecular cianobacterias provenientes de cuerpos de agua circundantes a la ciudad Leticia y detectar la presencia de metabolitos secundarios, no solo constituye un acercamiento a la biodiversidad de cianobacterias cultivables, sino

también a nuevas fuentes de agentes antimicrobianos, así como innovación en bioprospección para Amazonia colombiana.

4. LA IMPORTANCIA DE LO PEQUEÑO, EXPERIENCIAS CON COMUNIDADES ESTUDIANTILES DE LETICIA

4.1 Resumen

El trabajo de investigación desarrollado tuvo un taller de socialización con estudiantes de básica secundaria de la Institución Educativa San Juan Bosco, el taller se dividió en tres componentes: identificación del público objetivo; determinado por la cantidad de alumnos que asistían con regularidad a la institución así como la disposición que tenían para la realización del taller, los conocimientos previos a la socialización, en el cual los estudiantes expresaban a través de dibujos e historias el concepto de microorganismo así como la relación de estos con el medio en el que habitan y por último la socialización de los resultados referentes a las cepas de cianobacterias aisladas e identificadas.

Se identificó un significativo interés en conocer e investigar cianobacterias, sin embargo; esta motivación se ve opacada por las faltas de oportunidades para acceder a dicho conocimiento. Durante la fase de sondeo de conocimientos previos se llegó a la conclusión de que existe una percepción hacia las cianobacterias como agentes perjudiciales reflejo de la contaminación antropogénica.

4.2 Introducción

La Región sur Amazónica de Colombia geográficamente se encuentra conformada por los departamentos de Amazonas, Caquetá y Putumayo; culturalmente en estas regiones habitan 32 de los 90 grupos étnicos existentes en Colombia, los cuales pertenecen a 14 familias lingüísticas (Ruiz y otros, 2007).

El departamento de Amazonas, cuya extensión es de 109.655 km² se encuentra subdividido a su vez en: dos municipios: Leticia y Puerto Nariño; y 9 corregimientos departamentales: Tarapacá, La Pedrera, Puerto Arica, Puerto Santander, Mirití-Paraná, El Encanto, La Chorrera, Puerto Alegría y La Victoria.

La población del municipio de Leticia es mayoritariamente indígena (60%), entre los grupos preponderantes se encuentran los Huitotos, Yaguas, Ticunas, Yucunas, Matapí, etc (Parra, 2017). Leticia cuenta con 7 instituciones educativas oficiales con calendario A y 37 establecimientos educativos del casco urbano y rural, en donde predomina la población indígena. Debido a ello son numerosos los estudios que se han realizado en esta región, con el fin de encontrar un balance entre la educación occidental y la propia. Dicha estructuración se debe realizar desde las bases y los pilares de la educación ya que es necesario reconocer la identidad propia de los pueblos indígenas, reconociendo el sistema de conocimientos, practicas, creencias, valores, visiones y economía (Arbeláez y Vélez , 2008).

Antes de implementar metodologías de enseñanza del mundo de los microorganismos, es necesario conocer la visión y la perspectiva de la población local sobre estos. Por ello, el trabajo desarrollado tuvo como objeto dar a conocer el mundo de los microorganismos en especial las cianobacterias a estudiantes de bachillerato de manera didáctica. El trabajo tuvo como pilar, conocer la percepción local y ancestral que tienen los estudiantes sobre dichos organismos y fomentar el interés por la preservación, el cuidado y la investigación de cianobacterias, permitiendo la apropiación del conocimiento generado.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Área de estudio

El taller de socialización se realizó en la institución Educativa técnica indígena San Juan Bosco, ubicada en la vía los Lagos km 2, coordenadas 4°11'18.3"S 69°56'59.9"W. Especialidades agropecuarias y etnoeducación, educación básica primaria, básica secundaria y media vocacional, población predominada por Huitotos, Yagua, Yukuna, Inga, Cocama, Tikuna, Bora y Ocaina.



Figura 4-1 A) Institución Educativa San Juan Bosco, B) Leticia. Tomada de: Google Maps.

La población objetivo fueron estudiantes de básica secundaria, el colegio cuenta con subdivisiones por grados por lo que se trabajó con 3 a 5 grupos por grado (Tabla 4.1).

Se realizaron 3 etapas:

Reconocimiento: En esta primera etapa se eligió los cursos de interés para realizar la socialización del presente trabajo, los parámetros en cuenta fueron: Interés por parte del curso en tomar la charla, cantidad de estudiante asistiendo al colegio (mínimo 50% del total del curso) y disposición para realizar las actividades planteadas.

Conocimientos previos: Los estudiantes en material didáctico (tabla 4.1) plasmaron lo que conocían como microorganismos, respondiendo las preguntas planteadas en el taller 1.

Preguntas taller 1

1. ¿Para usted que son las cianobacterias?
2. ¿Dónde las podemos encontrar?
3. ¿Cómo considera que son? Realice un dibujo
4. ¿Qué papel cumplen en el ecosistema?
5. ¿Para el ser humano, son buenas, malas o no hacen nada?

Socialización del trabajo: Se realizó la socialización del trabajo de investigación, para ello se proyectaron imágenes y videos de las cianobacterias identificadas y aisladas, así como los resultados obtenidos. Una vez culminada la charla se evaluó los conocimientos adquiridos por los estudiantes a través del taller 2.

Preguntas taller 2

1. ¿Para usted que son las cianobacterias?
2. ¿Dónde podemos encontrarlas?
3. Realice un dibujo a nivel macroscópico y microscópico de acuerdo a lo observado
4. ¿Qué papel cumplen en el ecosistema?
5. ¿Para el ser humano, ¿Son buenas, malas o no hacen nada?

Tabla 4-1 Cronograma de actividades desarrolladas en el Colegio Indígena San Juan Bosco.

Curso	Actividad	Materiales	Resultado esperado
	Visita a la Institución Educativa San Juan Bosco	Libros	Lista de los grados en los que se realizaran la socialización
Sexto	Los estudiantes realizaran dibujos, maquetas, ilustraciones relacionadas a microorganismos, su importancia cultural, religiosa y económica.	Papel block Tijeras Colores Pinceles Tempera Colbón Escarcha Lápiz Borrador Sacapuntas	Dibujos, maquetas, pinturas relacionadas a microorganismos
Séptimo	Los estudiantes realizaron dibujos, maquetas, ilustraciones relacionadas a microorganismos, su importancia cultural, religiosa y económica.	Papel block Tijeras Colores Pinceles Tempera Colbón Escarcha Lápiz Borrador Sacapuntas	Dibujos, maquetas, pinturas relacionadas a microorganismos
Octavo	Los estudiantes realizaron dibujos,	Papel block	Dibujos, maquetas,

	maquetas, ilustraciones relacionados a microorganismos, su importancia cultural, religiosa y económica.	Tijeras Colores Pinceles Tempera Colbón Escarcha Lápiz Borrador Sacapuntas	pinturas relacionadas a microorganismos
Sexto	Exposición a cargo de la Estudiante de Maestría Alejandra, sobre los resultados obtenidos durante la investigación. Observación de imágenes al microscopio Dibujar los microorganismos observados.	Computador Video Beam Microscopio Muestras biológicas Papel block Tijeras Colores Pinceles Tempera Colbón Escarcha Lápiz Borrador Sacapuntas	Fotos del evento con los estudiantes. Dibujos de los microorganismos observados al microscopio Comparación de los dibujos y exposición de ambas actividades.

<p>Séptimo</p>	<p>Exposición a cargo de la Estudiante de Maestría Alejandra, sobre los resultados obtenidos durante la investigación.</p> <p>Observación de microorganismos.</p> <p>Dibujar los microorganismos observados</p>	<p>Computador</p> <p>Video Beam</p> <p>Microscopio</p> <p>Muestras biológicas</p> <p>Papel block</p> <p>Tijeras</p> <p>Colores</p> <p>Pinceles</p> <p>Tempera</p> <p>Colbón</p> <p>Escarcha</p> <p>Lápiz</p> <p>Borrador</p> <p>Sacapuntas</p>	<p>Fotos del evento con los estudiantes.</p> <p>Dibujos de los microorganismos observados al microscopio</p> <p>Comparación de los dibujos y exposición de ambas actividades.</p>
-----------------------	---	--	---

Octavo	Exposición a cargo de la Estudiante de Maestría Alejandra, sobre los resultados obtenidos durante la investigación. Observación de microorganismos. Dibujar los microorganismos observados	Computador	Fotos del evento con los estudiantes. Dibujos de los microorganismos observados al microscopio Comparación de los dibujos y exposición de ambas actividades.
		Video Beam	
		Microscopio	
		Muestras biológicas	
		Papel block	
		Tijeras	
		Colores	
		Pinceles	
		Tempera	
		Colbón	
Escarcha			
Lápiz			
Borrador			
Sacapuntas			

4.4 Resultados y Discusión

Durante las tres etapas que competen a este objetivo, los resultados fueron los siguientes:

Reconocimiento: Se realizó un sondeo en los cursos de básica secundaria y media vocacional. Los grupos de estudiantes que presentaron mayor interés en la actividad de socialización se centró en los grados 6to a 8vo. Los grados 9 a 11, fueron cursos con baja participación académica, menos del 60% de la población asistió a las clases, de este rango solo 10% le interesaba atender el taller. Los grados que presentaron mayor aceptación fueron 6to y 7mo solo hasta 702, la atención media se dio entre los grados 7mo (703 a 705) y 8vo (801 a 803). Del cuerpo estudiantil el 90% pertenecen a la etnia

Tikuna, seguida por Huitotos con un 6% y restante entre las etnias Bora, Cocama, Yukuna, Matapí, Tanimuca, Yaguas, Inga y Ocaina (Tabla 4.2). Los mestizos se dividen en dos: aquellos que tienen ambos padres colonos y aquellos con un padre colono y otro indígena (el colegio tiene como política enseñar que no existe el hombre blanco, sino que todos somos en algún grado producto del mestizaje).

Tabla 4-2 Número de alumnos y Etnias a las que pertenecen los estudiantes del Colegio Indígena San Juan Bosco.

Grado	No estudiantes	Etnias Presentes	Rango de Edad
601	30	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna Matapí	11-13 años
602	28	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna	11-14 años
603	32	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna Inga Yagua	11-14 años
604	27	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama	13-16 años

		Yukuna	
701	25	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna	13-14 años
702	30	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna Yagua	13-14 años
703	28	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna	14-17 años
704	18	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna	15-17 años
705	20	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama	15-17 años

		Yukuna	
801	25	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna Yagua	13-15 años
802	27	Tikuna Huitoto Mestizo Bora Cocama Yukuna	13-15 años
803	17	Tikuna Huitoto Mestizo Bora	15- 18 años

Conocimientos previos: Durante la fase de conocimientos previos, los estudiantes dibujaron, como se veían los microorganismos dentro de la lama verde (blooms o afloramiento de cianobacterias) y el 95% expuso que los organismos allí presentes eran perjudiciales para la salud de las personas, el 5% restante opinaron que no importaba ya que no afectaban su vida cotidiana.

Las respuestas más recurrentes frente a las preguntas del taller 1 fueron:

- Son bacterias que viven en el agua, que matan peces y pueden causar dolor de estómago.
- Son hongos microscópicos que crecen y forman ese color verde, que viven en todos lados y no hacen nada.

- Son bacterias muy malas que aparecen cuando hay mucha suciedad y se comienza a poner verde el agua.



Figura 4-2 Estudiantes del Colegio Indígenas San Juan Bosco, cursos de 6to a 8vo.

Aunque más del 80% de los estudiantes no logro acertar gráficamente a la forma de una bacteria, si se reconoce la existencia de las mismas, así como los daños que puede causar a la población, en especial cuando se encuentran en cuerpos de agua con coloración oscura o verde-azulada. Aquellos que respondieron que las cianobacterias eran hongos, explicaban que las raíces del hongo son las que se pueden ver en el agua como si fuera una lama o mota, y el cuerpo del hongo eran las partes más oscuras e infladas.

Ningún estudiante dio opiniones positivas sobre estos organismos, argumentando que solo aparecen cuando hay un exceso de contaminación en el ambiente y que aparecieron una vez el hombre comenzó a destruir y contaminar (Figura 4.3).

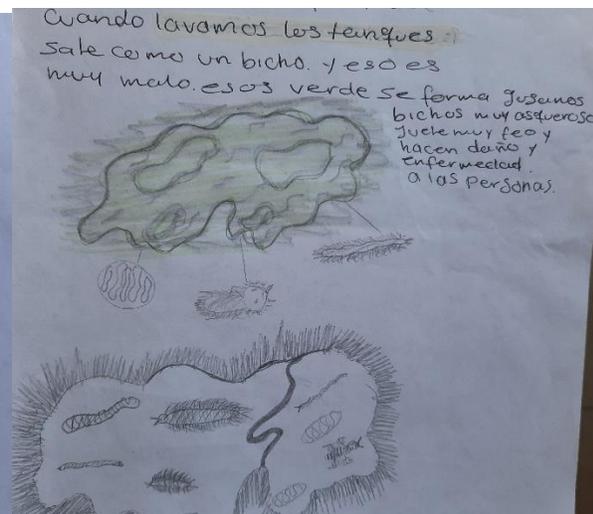
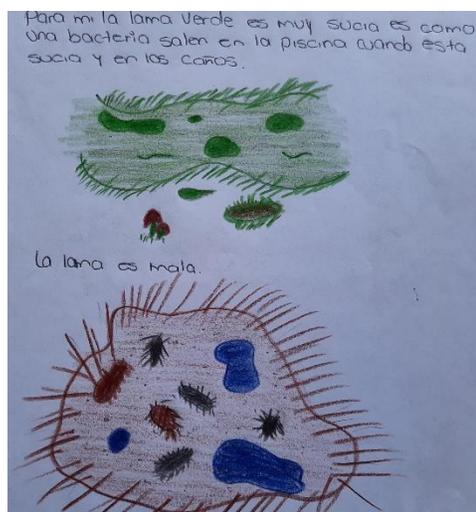
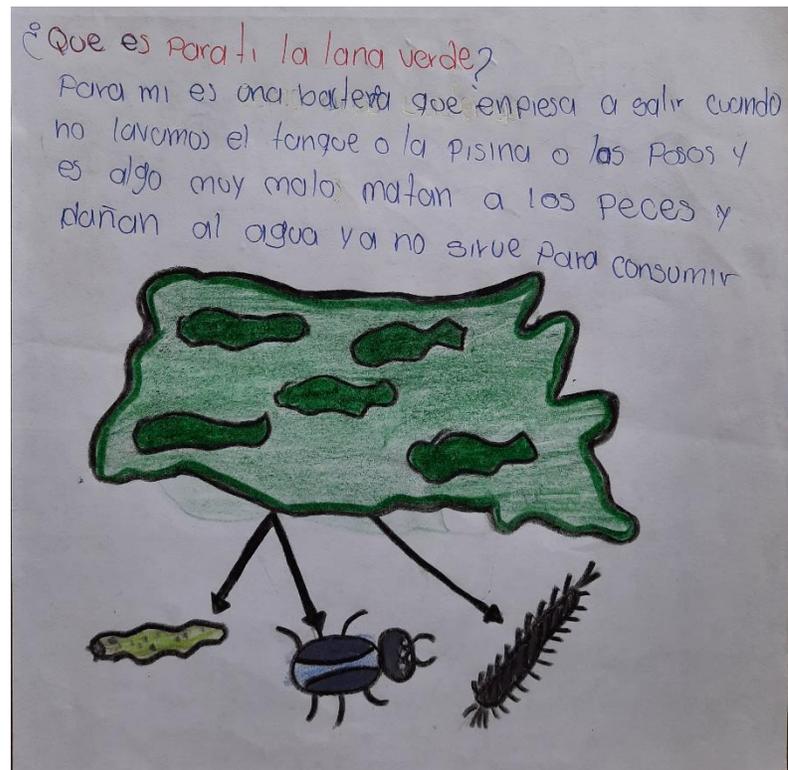


Figura 4-3 Definición de "Lama verde" según los conocimientos previos de los estudiantes.

Socialización del trabajo: La socialización del trabajo inicio con un relato a manera de cuento sobre el origen de las cianobacterias (Información asociada al capítulo 1), una vez terminado el relato se procedió a hablar sobre la importancia de las cianobacterias para el ecosistema y el ser humano.

Terminada esta primera parte, se procedió a dar a conocer el proceso de recolección y cultivo de cianobacterias, así como los resultados obtenidos para las pruebas antimicrobianas y antifúngicas.



Figura 4-4 Presentación de métodos de cultivo y aislamiento de cianobacterias a estudiantes del colegio Indígena San Juan Bosco.

Debido a la falta de equipos como microscopios en la institución educativa y a las restricciones que aún se manejan en torno a Emergencia Sanitaria por Covid-19, no se logró llevar a los estudiantes a las instalaciones de la Universidad Nacional para que conozcan las cianobacterias en vivo, sin embargo, los alumnos lograron observarlas a partir de las cajas de Petri y botellas de cultivo, así como videos de muestras de aguas y microorganismos que allí se encuentran (Figura 4.5)



Figura 4-5 Imagen de una Cianobacteria del género *Oscillatoria* a estudiantes del colegio Indígena San Juan Bosco.

El trabajo y el proyecto tuvo una gran acogida por los estudiantes debido a lo innovador que resulto ser la metodología de trabajo. Para culminar, se realizó el taller 2 (Ver anexo 2) en el que los estudiantes nuevamente respondieron 5 preguntas, siendo las respuestas más comunes (figura 4.6):

- Las cianobacterias, son bacterias antiguas que nacieron antes que el hombre, que tienen un color verde porque hacen fotosíntesis como las plantas.
- Son importantes porque nos dan el oxígeno y pueden comerse, usar como medicaméntenos o para producir energía.

- Las podemos encontrar en muchos ambientes, desde los polos hasta termales.
- Son buenas, pero necesitamos estudiarlas más, para saber cómo aprovecharlas.
- Si permitimos que crezcan indiscriminadamente podríamos tener problemas de salud porque también son tóxicas.

Durante la socialización se observó interés en los estudiantes por saber más acerca de las cianobacterias y microorganismos en general, sin embargo, la ausencia de recursos físicos en la Institución educativa, no permite el desarrollo de actividades que de manera práctica podrían incentivar el desarrollo de habilidades asociadas de dicho interés.

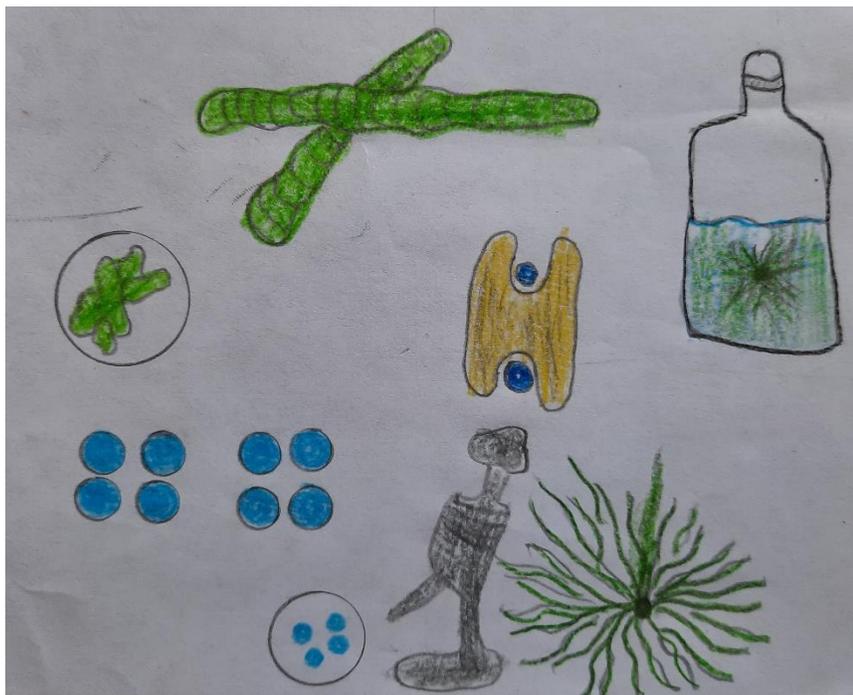


Figura 4-6 Dibujo realizado por estudiante de 6to grado, en donde ilustra los materiales y el procedimiento necesario para el cultivo de microorganismos.

Por último, los estudiantes expresaron su interés por aprender más sobre los microorganismos y temas relacionados a la biología en general, sin embargo, la ausencia de herramientas que permitan visualizar los temas tratados reduce el interés del estudiante al punto de no considerar relevante los conocimientos referentes a esta asignatura, aun cuando estos se encuentran inmersos en un entorno de biodiversidad.

4.5 Conclusiones

El taller de socialización tuvo una buena recepción por parte de estudiantes pertenecientes a los grados 6to, 7mo y 8vo, los cuales participaron de manera activa en todas las actividades propuestas. Los estudiantes de grados superiores no presentaron mayor interés en el evento optando por realizar actividades deportivas o de ocio.

Los estudiantes que participaron en el taller reconocen a los microorganismos como entidades que perjudican el bienestar de las personas y animales, sin embargo, consideran que al ser algo tan pequeño el daño es mínimo y por ello no toman medidas de prevención frente a cuerpos de aguas contaminadas.

No se evidenció una relación ancestral entre los microorganismos y las comunidades a las cuales pertenecen los estudiantes, por ello la conclusión general entre los estudiantes, es que surgieron a partir de la contaminación provocada por el hombre.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Las investigaciones en cianobacterias de agua dulce y en especial las del trapecio Amazónico deben tener un enfoque polifásico, teniendo en cuenta información de carácter morfológico, ecológico y fisiológico, con datos derivados de la secuenciación molecular.

El medio de cultivo BG-11 resultó óptimo para el cultivo de cianobacterias provenientes de humedales de la región de Leticia. Las cianobacterias filamentosas se adaptaron con mayor facilidad al medio de cultivo produciendo biomasa suficiente para la ejecución de las pruebas antimicrobianas y antifúngicas, así como también las pruebas moleculares.

Se aislaron y cultivaron *In vitro* dos especies del género *Limnothrix*, identificadas molecularmente como *Limnothrix planktonica* y *Limnothrix sp.* así como también un consorcio entre *Oscillatoria sp.* y *Lyngbya sp.*, las cuales arrojaron resultados positivos en las pruebas de inhibición contra el hongo *Penicillium*, y bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*), resultados sustentados por las pruebas moleculares basadas en la amplificación de genes asociados a metabolitos secundarios respecto a los dominios KS y el dominio A. Estos resultados fueron positivos en un 100%.

La socialización de los resultados en la Institución educativa San Juan Bosco, tuvo una gran acogida por parte de los estudiantes de grados 6to, 7mo y 8vo, los cuales estuvieron prestos a la realización de las actividades programadas. Se evidenció un leve conocimiento sobre las cianobacterias, el cual evidenciaba una percepción negativa de las mismas, debido a la constante asociación de estos organismos con la contaminación.

5.2 Recomendaciones

Actualmente, para la Amazonia colombiana se tienen escasos registros de estudios en torno a las cianobacterias tomando como punto de comparación el mismo a lo largo del área de influencia de la cuenca en otros países. Por tal motivo, se evidencia la necesidad de fomentar la investigación de estos organismos, así como profundizar en el potencial biotecnológico de los mismos para la región. Esta tarea, puede realizarse originando espacios dentro de las instituciones locales tales como la Universidad de Colombia sede

Amazonia y creando alianzas con centros de investigación interesados en el tema tales como SINCHI Y Corpoamazonia.

El género *Limnothrix* se reporta por primera vez para la Amazonia colombiana y las pruebas antimicrobianas y antifúngicas arrojaron resultados positivos, por lo cual se recomienda ampliar el estudio, en escenarios en los que se enfatice en aumentar la producción de biomasa y adicionalmente, ejecutar pruebas de los extractos obtenidos con diferentes solventes orgánicos con el fin de identificar las moléculas bioactivas existentes.

Socializar los resultados de las investigaciones realizadas en la región conlleva a la inclusión de los habitantes, permitiendo la apropiación y el aprovechamiento de dicho conocimiento, sin embargo, la ausencia de equipos físicos acaece en el desinterés generalizado en torno a estos organismos. Por tal motivo, se recomienda ampliar el proceso de socialización y que no se encuentre limitado a las instituciones educativas de educación superior, sino hacerlo extensivo a las comunidades que se ven afectadas o conviven con cianobacterias.

Anexo A: Medio BG – 11

Para todos los cultivos se usó el medio BG -11 modificado (Allen 1968; Allen y Stanier, 1968; Rippka y otros., 1979 en Andersen, 2005). Los medios solidos se adicioneo 1,5% de Agar.

Medio BG – 11

(Allen 1968, Allen and Stanier 1968, Rippka y outros. 1979)

Componente	Solución Stock (g·L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad	Concentración final de medio (M)
Solución Citrato de Hierro		1 ml	
Ácido Cítrico	6	1 ml	3.12×10^{-5}
Citrato de Amonio Férrico	6	1 ml	$\sim 3 \times 10^{-5}$
NaNO ₃	-	1.5 g	1.76×10^{-2}
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	40	1 ml	1.75×10^{-4}
MgSO ₄ * 7H ₂ O	75	1 ml	3.04×10^{-4}
CaCl ₂ * 2H ₂ O	36	1 ml	2.45×10^{-4}
Na ₂ CO ₃	20	1 ml	1.89×10^{-4}
MgNa ₂ EDTA * H ₂ O	1.0	1 ml	2.79×10^{-6}
Solución metales traza	Ver anexo 1.1	1 ml	-

Anexo 1.1: Solución Metales Trazas para medio BG-11

Esto también se conoce como solución de metales traza A5 + Co. A 950 mL de dH₂O, agregue el EDTA y otros componentes; llevar el volumen final a 1 litro.

Solución Metales Trazas			
Componente	Solución Stock (g*L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad	Concentración final de medio (M)
H ₃ BO ₃	-	2.860 g	4.63 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ * 4H ₂ O	-	1.810 g	9.15 x 10 ⁻⁶
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	-	0.220 g	7.65 x 10 ⁻⁷
CuSO ₄ * 5H ₂ O	79.0	1 ml	3.16 x 10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	-	0.391 g	1.61 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	49.4	1 ml	1..70 x 10 ⁻⁷

Anexo B: Guía a desarrollar en el taller de divulgación

El maravilloso mundo de los pequeños

Actividad de divulgación de la tesis de Maestría Potencial biotecnológico de cianobacterias provenientes de humedales de la región de Leticia, Colombia

Lugar: Institución Educativa Técnica Indígena San Juan Bosco, ubicada en la vía los lagos km 2.

Fecha: 21 de febrero al 24 de febrero del 2022

Persona a cargo: Alejandra Andrade Silva

El trabajo de socialización de la investigación se realizará en la institución educativa técnica indígena San Juan Bosco, ubicada en la vía los lagos km2, coordenadas -4.188418, -69.949978. Especialidades agropecuarias y etnoeducación, educación básica primaria, educación media y bachillerato, población predominada por Huitotos, Yagua, Yukunas, Inga, Cocama, Tikuna, Bora y Ocaina.

Objetivo: Socializar en colegios públicos de la ciudad de Leticia, sobre la importancia ecológica y biotecnológica de las cianobacterias en la Amazonia.

Preguntas taller 1

6. ¿Para usted que son las cianobacterias?
7. ¿Dónde las podemos encontrar?
8. ¿Cómo considera que son? Realice un dibujo
9. ¿Qué papel cumplen en el ecosistema?
10. ¿Para el ser humano, son buenas, malas o no hacen nada?

Preguntas taller 2

6. ¿Para usted que son las cianobacterias?
7. ¿Dónde podemos encontrarlas?
8. Realice un dibujo a nivel macroscópico y microscópico de acuerdo a lo observado
9. ¿Qué papel cumplen en el ecosistema?
10. ¿Para el ser humano, ¿Son buenas, malas o no hacen nada?

Bibliografía

- Abed, R. M., y otros. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of applied microbiology*, 106: 1-12. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x
- Akagha, S., y otros. (2019). *Lagosinema tenuis* gen. et sp. nov. (*Prochlorotrichaceae*, Cyanobacteria): a new brackish water genus from Tropical Africa. *Fottea, Olomouc*, 19(1): 1-12.
- Al-Haj, L., y otros. (2016). Cyanobacteria as Chassis for Industrial Biotechnology: Progress and Prospects. *Life*, 6(4): 42. doi:10.3390/life6040042
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Andrade-Sossa, C. (2011). Efectos de la fluctuación del nivel del agua sobre la estructura del ensamblaje de rotíferos en el lago largo (sistema Yahuaraca - llanura de inundación del río Amazonas - Colombia). *Caldasia*, 33(2): 519-537.
- Andreote, A., y otros. (2014). Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *Journal of Phycology*. doi:10.1111/jpy.12192
- Arbeláez, J., y Vélez, P. (2008). La etnoeducación en Colombia: Una mirada Indígena. *Monografía. Universidad Eafit*.
- Ayala, F. (2017). Búsqueda de compuestos con posible actividad a partir de Cyanobacterias marinas del Caribe colombiano. *Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.*
- Baker, P. (1992). Identification of *Common Noxious Cyanobacteria* Part II– *Chroococales Oscillatoriales*: Urban Water Research Association of Australia. *Research Report*, 46.
- Ballesteros, I., y otros. (2021). DNA barcoding approach to characterize microalgae isolated from freshwater systems in Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 7 (1): 170 - 183. doi:10.1080/23766808.2021.1920296

- Bayona, L. (2014). Estudio químico y evaluación de la actividad citotóxica de metabolitos secundarios provenientes de Cyanobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano. *Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.*
- Becerra, L. (2017). Evaluación del perfil metabólico de un consorcio de Cyanobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano bajo condiciones de cultivo. *Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.*
- Berland, B., y otros. (1989). Interaction de la salinité et de la température sur la morphologie, la croissance et la composition cellulaire d'une Cyanobactérie halotolerante (*Aphanothece* sp.). *Botanica Marina*, 132 (4): 317-329.
- Bonilla, S. (2009). Manual para la identificación y medidas de gestión. Montevideo, Uruguay: UNESCO.
- Briñez, K., Guarnizo, J., y Arias, S. (2012). Calidad del agua para consumo humano en el departamento del Tolima. *Rev. Fac. Nac. Salud Publica*, 30(2): 175-182.
- Brito, A., y otros. (2015). Bioprospecting Portuguese Atlantic coast cyanobacteria for bioactive secondary metabolites reveals untapped chemodiversity. *Algal Research*, 9: 218-226.
- Broniatowska, B., y otros. (2011). Antiprotozoal, Antitubercular and Cytotoxic Potential of Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Extracts from Ireland. *Natural Product Communications*, 6(5): 689-693.
- Burgos-Hernández, M., y Castillo-Campos, G. (2017). Flora de Veracruz: *Gunneraceae*. Xalapa, Veracruz, Mexico: Instituto de Ecología A.C.
- Camacho, K. (1998). Fitoplancton en dos lagos de meandro de la llanura de inundación del río Metá (Caquetá Medio) durante dos periodos del año. *Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Trabajo de grado Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá.*
- Cano, J. (2018). Conservación in vitro y cultivo de Cyanoprocaritas bentónicas arrecifales. *Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.*
- Canope, D. G., y otros. (2005). Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: an important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochem Cycles*. doi:10.1029/2004GB002331
- Cantoral-Uriza, A., y otros. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de Prevención. *Hidrobiológica*., 27: 241-251.

- Carvalho, L. R., y otros. (2013). Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: *In vivo* and *In vitro* aspects. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 23(3): 471-580. doi:10.1590/S0102-695X2013005000037
- Chen, S., y otros. (2007). Current experimental therapy for Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol*, 5: 127-134.
- Choi, H., Engene, N., Smith, J., Preskitt, L., y Gerwick, W. (2010). Crossbyanols A-D, toxic brominated polyphenyl ethers from the Hawaiian bloom-forming cyanobacterium *Leptolyngbya crossbyana*. *Journal of Natural Products*, 73: 517-522.
- Christiansen, G., y otros. (2001). Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. *Archives of Microbiology*, 176(6): 52 - 58. doi:10.1007/s002030100349
- Colla, L. M., y otros. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour Technol.*, 98: 1489-1493.
- Conforti, V., y Nudelman, M. A. (1994). Ultrastructure of the lorica of *Trachelomonas* Ehr. From the colombian Amazonia. *Rev. Hydrobiol. Trop.*, 27(4): 1-26.
- Contreras, M. Y., y Acevedo, K. (2013). El acceso al agua para consumo humano en Colombia. *Revista de Economía Institucional*, 15(29): 125-148.
- Corrales, M., y otros. (2017). Identification and molecular characterization of tropical cyanobacteria of the genus *Nostoc*, *Calothrix*, *Tolypothrix* and *Stytonema* (*Nostoclaes: Nostocaceae*) with possible biotechnological potential. *Cuadernos de Investigación UNED*, 9: 280-288. doi:10.22458/urj.v9i2.1710
- Cunha de Oliveira, E. D., y otros. (2019). Morphological and molecular characterization of cyanobacterial isolates from the mouth of the Amazon River. *Phytotaxa*, 387(4): 269-288. doi:10.11646/phytotaxa.387.4.1
- D'Agostino, G., y otros. (2006). A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*.
- Del Cerro, C. (2015). Desarrollo de herramientas moleculares para la producción de Policétidos y Péptidos no Ribosomales. *Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid*.
- Demain, A. L., y Fang, A. (2001). The natural functions of secondary metabolites. En A. Fichter, *History of Modern Biotechnology I* (págs. 1-39). Berlin, Germany: Springer.

- Drago, E. (2007). The Physical Dynamics of the River-Lake Floodplain System. En: Iriundo MH, *The Middle Paraná Rier: Limnology of a Subtropical Wetland*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Duque, S. (2010). Amazonia: un mundo de agua y complejas relaciones. Cátedra Jorge Eliécer Gaitán (1 semestre 2010: Bogotá) Amazonia colombiana: imaginarios y realidades I Cátedra Jorge Eliécer Gaitán.
- Duque, S. (2011). Valoración integral del flujo histórico y actual de carbono en el sistema de inundación Yahaurcaca (Amazonia Colombiana): Su importancia en el cambio climático global. *Programa Bicentenario - Amazonia*.
- Duque, S. R. (1988). Estudio de humedales en la Amazonia colombiana. pp: 73-92. En: Guerrero E. (ed.). 1998. *Una aproximación a los humedales en Colombia*. Unión Mundial Para la Naturaleza UICN, Fondo FEN Colombia.
- Duque, S. R. (1995). Euglenofitas pigmentadas de la Amazonia colombiana. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 19(75): 651-659.
- Duque, S. R., y Núñez-Avellaneda, M. (1997a). Catálogo ilustrado y biología de las comunidades de algas asociadas a los ambientes acuáticos de la Amazonia Colombiana. *Informe. Instituto Sinchi*.
- Duque, S. R., y Núñez-Avellaneda, M. (1997b). Ficoflora de algunos ambientes acuáticos de la Amazonia colombiana. *Caldasia*, 19(1-2):37-42.
- Duque, S. R., y Núñez-Avellaneda, M. (2000). Microalgas acuáticas de la Amazonia colombiana. *Biota Colombiana*, 1(2): 208-216.
- Duque, S. R., y otros. (2007). Ecosistemas acuáticos. En S. L. Ruiz, y otros, *Diversidad Biológica y cultural del sur de la Amazonia Colombiana - Diagnóstico* (págs. 85-97). Bogotá: Corpoamazonia, Instituto Humboldt, Instituto Sinchi, UAESPNN.
- Duque, S. R.; et al. (2018). Acotamiento de la ronda hídrica de la quebrada Yahuarcaca en la zona urbana del municipio Leticia, departamento del Amazonas. Leticia: Conveio 588 de 2016 entre UN Sede Amazonia y Corpoamazonia.
- Echenique, R. O., Núñez-Avellaneda, M., y Duque, S. R. (2004). 4. Chlorococcales de la Amazonia Colombiana I: Chlorellaceae y Scenedesmaceae. *Caldasia*, 26(1): 37-51.
- El Samak, M., y otros. (2018). Antimicrobial activity of bacteria isolated from Red Sea marine invertebrates. *Biotechnology Reports*. doi:10.1016/j.btre.2018.e00275 BTRE 275 To

- Fernandez, G. (2009). La crisis del agua en America Latina. *Revistas Estudios Culturales*, 4: 80 - 96.
- Fiore, M., Neilan, B. A., Copp, J. L., Tsai, S. M., Lee, H., y Trevors, J. (2005). Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. *Water Research*, 39: 5017–5026. doi:10.1016/j.watres.2005.10.002
- Forero, M. (2019). Determinación de Cyanoprokaryotas planctónicas y su potencial en la producción de cianotoxinas en un embalse de la sabana de Bogota - Colombia. *Tesis de Maestria*.
- Francis, P., y otros. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer disease; a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66: 137-147.
- Furtado, A., y otros. (2009). Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia*, 627: 195-209.
- Furtado, A., Calijuri, M., Lorenzi, A., Honda, R., Genuário, D., y Fiore, M. (2009). Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia*, 627: 195 - 209. doi:10.1007/s10750-009-9728-6
- Galeano, J. E., y Villalobos, J. A. (2011). Cianobacterias y Microcistinas en el Caribe Colombiano: Identificación de Cianobacterias y Detección de Microcistinas en el Angu Delta del Río Sinú Córdoba - Colombia. *EAE Editorial Academia Espanola*.
- García-Pichel, F., y otros. (2001). Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crust from the Colorado plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1902-1910.
- Gaston, K. J. (2000). Global patterns in biodiversity. *Nature*, 405: 220-227.
- Ghosh, T., y otros. (2008). Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*, 19: 2-15.
- Goldblatt, C., y Otros. (2006). Bistability of atmospheric oxygen and the great oxidation. *Nature*, 683-686.
- Gomes, G. D., Oliveira da Silva, V. C., Xavier, L. P., do Nascimento, R. B., Faustino, S., Schneider, M., y Santos, A. (2021). Glucosidase Inhibitors Screening in Microalgae and Cyanobacteria Isolated from the Amazon and Proteomic Analysis of Inhibitor Producing *Synechococcus sp.* GFB01. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms9081593

- González-Gil, S., y otros. (1999). Characterization of morphospecies and strains of *Pseudoanabaena* (Cyanophyceae) from laboratory cultures using antibodies and lectins. *European Journal of Phycology*, 34: 27 - 33.
- Grandez, M. A., Moreno, S. E., Rodriguez, H. N., Castro, C. G., Torres, M. M., Marapara del Aguila, J. L., Cobos, M. (2021). Aislamiento y caracterización molecular y bioquímica de una cianobacteria (*Anabaena* sp.) del río Amazonas, Loreto-Perú. *ECIPerú*, Volumen 18: 1. doi:10.33017/RevECIPeru2021.0005/
- Grewe, C. B., y Pulz, O. (2021). *The biotechnology of cyanobacteria*. in: Whitton, B.A. (Ed.) *Ecology of Cyanobacteria II*. Netherlands, Dordrecht: Springer.
- Grewe, C., y Pulz, O. (2012). The biotechnology of cyanobacteria. In: Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. Whitton B.(ed.). *Springer Science Business Media*, 707-733.
- Gutiérrez, M., y otros. (2010). Malyngolide Dimer, a Bioactive Symmetric Cyclodepside from the Panamanian Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 73(4): 709-211. doi:10.1021/np9005184
- Hallegraeff, G. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global. *Phycologia*, 32: 79-99.
- Hori, K., y otros. (1994). Hypocholesterolemic effect of blue-green algae, ishikurage (*Nostoc commune*) in rats fed atherogenic diet. *Plant Foods Hum Nutr*, 45: 974-982.
- Irisarri, P., y otros. (2001). Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3): 95-103.
- Ji, J.-K. (2021). Survey Report on Plant Plankton in Major Reservoirs in Gyeonggi-do. *Gyeonggi-do Institute of Health and Environment*, 1-173.
- Jones, M. R., y otros. (2021). CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Research*.
- Junk, W. J., y Wantzen, K. M. (2004). The flood pulse concept: new aspects, approaches, and applications-an update. En Welcomme, y Petr, *Proceedings of the second international symposium on the management of large rivers for fisheries* (págs. 117-140). Bangkok: FAO, RAP Publication.
- Junk, W., y otros. (1989). The flood pulse concept in river - floodplains systems. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 106: 110 - 127.

- Kaplan-Levy, R. N., y otros. (2016). Lake Kinneret phytoplankton: integrating classical and molecular taxonomy. *Hydrobiologia*, 764: 283-302.
- Kishore, K., y Bimal, R. (2010). Distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria (*Nostocaceae*) during rice cultivation in fertilized and unfertilized paddy fields. *Nordic Journal of Botany*, 28: 100-103. doi:10.1111/j.1756-1051.2009.00486.x
- Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51: 346 - 353. doi:10.1080/09670262.2016.1163738
- Komárek, J., y Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 4. *Nostocales*. *Algol Stud*, 56: 247-345.
- Komárek, J., y Anagnostidis, K. (2005). Cyanoprokaryota II. Teil *Oscillatoriales*. Jena, Alemania: Elsevier/Spektrum GmbH.
- Komárek, J., y otros. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera). using a polyphasic approach.: Preslia.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., y Johansen, J. (2014). *Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera)*. Using a polyphasic approach: Preslia 86: 295-335.
- Landsberg, J., y Shumway, S. (1998). Harmful algal blooms and their effects on marine and estuarine animals. *III International Symposium on Aquatic Animal Health. E.U.A*, 58-63.
- Lemus, N., y otros. (2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Limnothrix sp.* a diferentes salinidades y concentraciones de nitrato. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 15(1): 159-166.
- Leonard, S. G., y y otros. (2010). The effects of supplementing the diet of the sow with seaweed extracts and fish oil on aspects of gastrointestinal health and performance of the weaned piglet. *Livest. Sci.*, 134: 135-138.
- Lopiz, A. (2016). Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Revista Bionatura*, 79-87.
- Maderna, A., y otros. (2014). Discovery of cytotoxic dolastatin 10 analogues with N-terminal modifications. *J. Med. Chem*, 57: 10527-10543.
- Magana-Arachchi, D., y otros. (2011). Molecular characterization of cyanobacterial diversity in Lake Gregory, Sri Lanka. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(4): 898 - 904. doi:10.1007/s00343-011-0519-3

- Mehboob, A., Lucas, S., y Shahida, H. (2014). The morphology and bioactivity of the rice field cyanobacterium *Leptolyngbya*. *Rev. Biol. Trop.*, 62(3): 1251-1260.
- Méjean, A., y Ploux, O. (2013). CHAPTER SIX A Genomic View of Secondary Metabolite Production in Cyanobacteria. Vol. 65.
- Menezes, M., y otros. (2015). Update of the brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria. *Rodriguesia*, 1047-1062. doi:10.1590/2175-7860201566408
- Merel, S., y otros. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cianotoxins. *Environment International*, 59: 303-327.
- Min, H., y Sherman, L. (2010). Hydrogen production by the unicellular, Diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142 under conditions of continuous light. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13): 4293–4301.
- MINISTERIO DE AMBIENTE, V. Y. (2010). *Política Nacional para la Gestion Integral del Recurso Hídrico*. Bogotá D.C: Colombia, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 124 p.
- Mittermeier, R., y otros. (2002). *Areas silvestres - Las ultimas regiones virgenes del mundo*. México D.F.: CEMEX.
- Moffitt, M. C., y Neilan, B. A. (2001). On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiology Letters*, 196(2): 207–214. doi:10.1016/S0378-1097(01)00070-2
- Neiff, J. J. (1990). Ideas para la interpretación ecológica del Paraná. *Interciencia*, 15(6): 424-441.
- Nelan, B. A., y otros. (1999). Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 181(13): 4089–4097. doi:Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383979>
- Nieto, N. (2011). La gestión del agua: tensiones globales y latinoamericanas. *Política y Cultura*, 36: 157-176.
- Núbel, U., y otros. (1997). PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 68(8): 3327 - 3332.
- Núñez-Avellaneda. (2008). Microalgas acuáticas: La otra escala de la biodiversidad en la Amazonia colombiana. *Instituto Amazónico de investigaciones científicas - SINCHI*, 1-245.

- Núñez-Avellaneda, M., y Duque, S. R. (2001). Fitoplancton de algunos ríos y lagos de la Amazonia colombiana. En C. Zárate, y C. Franky, *IMANI MUNDO: Estudios de la Amazonia colombiana* (págs. 305-335). Bogotá D.C.: UNIBIBLOS.
- Núñez-Avellaneda, M., y Marciales-Caro, L. (2008). *CYANOPHYCEAE*. En M. Núñez-Avellaneda, *Microalgas acuáticas. La otra escala de la biodiversidad en la Amazonia colombiana* (págs. 45-65). Bogotá D.C.
- Núñez-Avellaneda, T., y Duque, S. R. (1998). *Chlorococcales* (Alga, Chlorophyceae) found in aquatic environments of the Colombian Amazon basin. *Caldasia*, 20(1): 7-13.
- Núñez-Avellaneda, T., y Duque, S. R. (2000). Desmidias (*Zygnemaphyceae*) de un pequeño tributario del Río Amazonas en Colombia. . *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 14(93): 493-498.
- Otten, T. G., y Paerl, H. (2015). Health effects of toxic cyanobacteria in US drinking and recreational waters: our current understanding and proposed direction. *Curr. Environ. Health Rep.*, 2: 75-84. doi:10.1007/s40572-014-0041-9
- Paerl, H., y Huisman, J. (2009). Climate Change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1: 27-37. doi:10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x
- Palacio, K., y otros. (2019). Características morfológicas de las cianobacterias y fitoplancton dominante en embalses de Antioquia: un enfoque basado en el biovolumen. *U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*.
- Palma, L. (2011). Efecto de la conectividad del río Amazonas en la ecología del fitoplancton en lagos amazónicos. Leticia: Tesos de maestría, Universidad Nacional de Colombia - Sede Amazonia.
- Parra, T. (2017). Tejiendo caminos para una enseñanza de la biología en contexto: una apuesta desde las concepciones sobre la danza Yüüechiga de la comunidad académica indígena Ticuna del resguardo ATICOYA del municipio de Puerto Nariño (Amazonas). *Tesis de pregrado. Bogotá D.C.*
- Peinador, M. (1999). Las cianobacterias como indicadores de contaminación orgánica. *Revista de Biología Tropical.*, 47(3): 381-391.
- Peña, J. M. (2019). *Potencial biotecnológico de Cianoprocariontes provenientes de Islas del Rosario, Colombia*. Bogotá D.C.: Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Pereira, D. A., y Giani, A. (2014). Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 88(1): 175-183.

- Pereira, P., y otros. (2001). *Co-occurrence of PSP toxins and microcystins in Montargil freshwater reservoir, Portugal*. Francia: ICO-UNESCO.
- Pérez, J. (2003). *caracterización de la secuencias ribosomales 16s (ADNr) de cianobacterias asociada a eventos de toxicidad*. La paz: Maestría.
- Pineda-Mendoza, R., y otros. (2011). Caracterización morfológica y molecular de Cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México. *Polibotánica*, 31: 31-50.
- Pineda-Mendoza, R., y otros. (2011). Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de Méxio. *Polibotánica*, 31: 31-50.
- Prada, S., y Donato, J. C. (1996). Evaluación del recurso hidrobiológico (fitoplancton, macrófitas y peces) y aspectos físicos y químicos de la laguna de Cartagena de Chaira en época de niveles bajos del agua. *Corpoamazonia*.
- Prato-Valderrama, J. A. (2013). *Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas de San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su papel ecológico*. Bogotá: Tesis de Maestría.
- Prieto, A., y Arias, J. C. (2007). Diversidad biológica del sur de la Amazonia Colombiana. En *Diversidad biológica y cultural del sur de la Amazonia colombiana-Diagnóstico-* (págs. 75-256). Bogotá D.C.: Ramos López Editorial Fotomecánica Ltda.
- Ramírez , J. C. (2013). La región Amazonica. *Amazonia Posible y Sostenible*, 1-7.
- Ramirez, S., Galindo, M., y Contreras, C. (2015). Justicia ambiental entre la eutopía y la realidad social. *Culturales*. , Época II - Vol. III - Núm. 1.
- Rasmussen, H. E., y otros. (2009). Alteration of the gastrointestinal microbiota of mice by edible blue-green algae. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04288.x
- Rastogi, R. P., y Sinha, R. P. (2009). Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 27(4): 521-539. doi:https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.009
- Rastogi, R. P., y Sinha, R. P. (2009). Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 27(4): 521-539. doi:10.1093/nar/gks1219

- Rigonato, J., y otros. (2017). Tropical cyanobacteria and their biotechnological applications. *Springer*. doi:10.1007/978-3-319-55804-2_7
- Ruangsomboon, S., y otros. (2013). Effects of low pH and Pb²⁺ stress on living cyanobacterium, *Phormidium angustissimum* West y G.S.West: A test of its feasibility as a living biosorbent. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-013-0004-9
- Ruiz, S. L., y otros. (2007). *Diversidad biológica y cultural al sur de la Amazonia colombiana- Diagnostico*. Bogotá D.C.: Ramos López Editorial Fotomecanica Ltda.
- Ruiz, S. L., y Valencia, M. (2007). Contextualización del sur de la Amazonia colombiana. *Diversidad biológica y cultural del sur de la Amazonia colombiana - Diagnóstico*, 31- 73.
- Salcedo-Hernández, M., y otros. (2012). Ecología del fitoplancton y dinámica hidrológica del sistema lagunar de Yahuaraca, Amazonas, Colombia: Análisis integrado de 16 años de estudio. *Mundo Amazonico*, 9-41.
- Salomon, S., y otros. (2020). Floraciones de cianobacterias en Colombia: estado del conocimiento y necesidades de investigación ante el cambio global. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.*, 44(171): 376-391. doi:10.18257/accefyn.1050
- Santamaría, C. A. (1995). Caracterización limnológica y pesquera de los sistemas lénticos pertenecientes al plano inundable del río Igará-Paraná con algunas sugerencias sobre el manejo de recursos pesqueros del resguardo indígena Predio Putumayo. *Informe Instituto Sinchi*.
- Sciuto, K., y otros. (2012). Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium strains* (Cyanobacteria). *Cladistics*, 28: 357-374. doi:10.1111/j.1096-0031.2011.00386.x
- Sekar, S., y Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol*, 20: 113-136.
- Sevillano, F., y otros. (1982). La asociación simbiótica fijadora de nitrógeno atmosférico. *Azolla - Anabaena*. *Centro de Edafología y Biología Aplicada, C.S.I.C.*
- Sharif, D. I., y otros. (2008). *Quorum sensing* in Cyanobacteria: n-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. *ISME J.*, 2(12): 1171-1182.
- Sharma, N., y otros. (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*, 23: 1059-1081.

- Shishido, T., y otros. (2020). Dereplication of Natural Products with Antimicrobial and Anticancer Activity from Brazilian Cyanobacteria. *Toxins*. doi:10.3390/toxins12010012
- SINCHI. (17 de 03 de 2022). *Instituto SINCHI*. Obtenido de Regiones de la Amazonia Suramericana: <https://sinchi.org.co/la-gran-amazonia-suramericana>
- Singh, S. P., y otros. (2017). Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69: 578-595. doi:[https://doi:10.1016/j.rser.2016.11.110](https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.110)
- Singh, S., Pathak, J., y Sinha, R. (2017). Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69: 578-595. doi: [10.1016/j.rser.2016.11.110](https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.110)
- Smith, E. C., y Craven, T. (1972). *A Comparison of the río Amazonas and the río Loreto-Yakú using chemical, phytoplankton and periphyton analysis*. Inédito.
- Soo, R., y otros. (2017). On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration. *Science*, 355: 1435-1440. doi:10.1126/science.aal3794
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425-448.
- Svrcek, C., y Smith, D. (2004). Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 3: 155-185. doi:10.1139/s04-010
- Swain, S. S., Paidesetty, S. K., y Padhy, R. H. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90: 760-776. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.030
- Tan, L. T. (2007). Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*, 68(7): 954-979. doi:10.1016/j.phytochem.2007.01.012
- Thajuddin, N., y Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 89(1): 47-57.
- Torres, K. M., Lopes, R. B., Passos, C. J., Pereira, A. C., y Moura, L. S. (2020). Dominance of potentially toxic cyanobacteria on the waterfront of Santarém, Tapajós River, Brazilian Amazon. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*. doi:10.6008/CBPC2179-6858.2020.006.0025

- Torres-Ariño, A. (2004). Uso de Cyanobacterias en la producción de antibióticos. *Ciencia y Ma*. Recuperado de <http://www.umar.mx/revistas/23/Cyanobacterias.pdf>.
- Torres-Bejarano, A. (2006). Ecología funcional del fitoplancton en el sistema de lagos Yahuaraca (Leticia-Amazonas). Bogotá: Tesis de pregrado, Universidad Pedagógica Nacional.
- Trevisan, M., y otros. (2003). Seleção de plantas com atividade anticolinesterásica para tratamento da doença de Alzheimer. *Quim Nova*, 26: 301-304.
- Tundisi, J. G., y otros. (2014). How many more dams in the Amazon. *Energy policy*, 74: 703-708.
- Valerio, E., y otros. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoir. *Microbiology*, 155: 642-656. doi:10.1099/mic.0.022848-0
- Valério, E., y otros. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*, 155(2): 642-656. doi:10.1099/mic.0.022848-0
- van Apeldoorn, M. E., y otros. (2007). Review: Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1): 7-60. doi:10.1002/mnfr.200600185
- van Apeldoorn, M. E., y otros. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 7-60. doi:10.1002/mnfr.200600185
- Vicente, V., y otros. (2004). Detection, isolation, and characterization of exopolysaccharide produced by a strain of *Phormidium* 94 a isolated from an arid zone of Mexico. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(3): 306- 310.
- Vidanarachchi, J. K., y y otros. (2009). Isolation and characterization of water-soluble prebiotic compounds from Australian and New Zealand plants. *Carbohydr. Polym*, 77: 670-676.
- Whitton, B. (2012). *Ecology of Cyanobacteria II*. Durham: Springer.
- Whitton, B., y Potts, M. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity Time and Space*. Netherlands: Springer Ed 1.
- Xianglinig, L., y otros. (2015). A novel freshwater cyanophage with a complex collar infects *Limnithrix planktonica*. *Phycologia*, 54(6): 578 - 582. doi:10.2216/15-82.1
- Zelík, P., y otros. (2009). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2): 531-536. doi:10.1080/1475636

Zhu, M., y otros. (2012). Taxonomic and phylogenetic evaluation of *Limnothrix* strains (Oscillatoria, Cyanobacteria) by adding *Limnothrix planktonica* strains isolated from central China. *Hydrobiologia*, 698: 367-374