

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Efecto del petróleo en microalgas marinas,
sobre el crecimiento heterotrófico y la
producción de metabolitos extracelulares**

Erika Andrea Puentes Sayo

Universidad Nacional de Colombia Sede Caribe
Instituto de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR,
Santa Marta, Colombia

2024

Efecto del petróleo en microalgas marinas, sobre el crecimiento heterotrófico y la producción de metabolitos extracelulares

Erika Andrea Puentes Sayo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias –Biología, Línea Biología Marina

Director:

PhD. Lina Blandón

Codirector:

Dr.rer.nat. Néstor Hernando Campos

Línea de Investigación:

Bioprospección de microorganismos marinos

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Bioprospección marina, INVEMAR

Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe

Instituto de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR

Convenio Universidad Nacional de Colombia – INVEMAR

Santa Marta, Colombia

2024

*Un poco de ciencia nos aleja de Dios, mucha
nos devuelve a Él.*

Louis Pasteur

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

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

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

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

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

Erika Andrea Puentes Sayo

Fecha: 17/07/2024

Agradecimientos

Agradezco al Instituto de investigaciones marinas y costeras, INVEMAR, por permitirme el ingreso a sus instalaciones como el uso de su infraestructura para la realización de este trabajo de investigación. Quiero destacar el apoyo de Javier Gómez León, Jefe de la línea de bioprospección marina quien me permitió formar parte de su equipo de trabajo.

De manera especial reconozco la colaboración del laboratorio METCORE de la Universidad de los Andes, con Mónica Cala como su líder, en la realización de los análisis espectroscópicos y en la actitud de servicio brindada. De igual manera, resalto el soporte brindado por el grupo de química orgánica de productos naturales de la Universidad de Antioquia, en donde fueron realizados los análisis iniciales de caracterización preliminar con espectrometría de masas de alto rendimiento, de los extractos libres de células obtenidos a partir de los tratamientos de exposición a petróleo de las microalgas.

Resumen

La contaminación marina es una gran amenaza para la conservación de los ecosistemas y de su biodiversidad, por lo que se hace necesario realizar estudios enfocados en su recuperación, aplicando tecnologías ambientalmente amigables y de bajo costo como la biorremediación. La biorremediación es el uso de organismos, sus células, partes o metabolitos, para recuperar un ambiente contaminado a través de la transformación o degradación de compuestos tóxicos recalcitrantes como los hidrocarburos, en una forma menos tóxica o no tóxica. En este sentido, el uso de microalgas y/o sus componentes, es una alternativa prometedora ya que presentan tolerancia a factores de estrés como los ocasionados por la presencia de petróleo en el entorno, evidenciando la producción de metabolitos como biosurfactantes participantes de la actividad biorremediadora. Este proyecto tuvo como objetivo principal evaluar la respuesta metabólica a la presencia del petróleo, a través de la detección de biosurfactantes extracelulares de microalgas marinas aisladas del Mar Caribe colombiano, en condiciones de luz y oscuridad, empleando herramientas metabólicas. Para ello, se realizó un screening de tolerancia celular con petróleo en suspensión al 1 %. Se evidenció la producción de un extracto extracelular rico en biosurfactantes, por *Nannochloris sp.*, la cual al ser incubada en oscuridad produjo un extracto con mayor presencia de estos compuestos. Los resultados obtenidos, aportan información científica que contribuye a mejorar el conocimiento del proceso de tolerancia al petróleo que exhiben algunas microalgas marinas.

Palabras clave: Contaminación, hidrocarburos, biorremediación, metabolitos bioactivos, biosurfactantes, tolerancia,

Abstract

Effect of crude oil on marine microalgae about heterotrophic growth and the production of extracellular metabolites

Marine pollution is a significant threat to ecosystem conservation and its biodiversity. Therefore, it is necessary to carry out studies focused on ecosystem recovery, applying environmentally friendly and low-cost technologies such as bioremediation. Bioremediation is the use of organisms, their cells, parts or metabolites, to remediate a contaminated environment through the transformation or degradation of recalcitrant toxic compounds such as crude oil into a less toxic or non-toxic form. In this sense, using microalgae and /or its components is a promising alternative. Microalgae can be tolerant to stress factors such as oil crude, in response, they can produce metabolites like biosurfactants that participates in the bioremediation activity. The main objective of this project was to evaluate the metabolic response of microalgae isolated from the Colombian Caribbean, exposed to the presence of crude oil, as well as the detection of extracellular biosurfactants, under light and dark conditions, using metabolomic tools. A screening with crude oil in suspension at 1% was carried out, achieving evidence of the production of extracellular extract rich in biosurfactants by a strain *Nannochloris sp.* The same strain cultured without light, produced this extract in greater quantity. The results provide scientific information that improves the knowledge of the tolerance process to crude oil that some marine microalgae exhibit.

Keywords: Pollution, hydrocarbons, bioremediation, biosurfactant, tolerance, bioactive metabolites

Contenido

	Pág.
1. Microalgas marinas tolerantes a petróleo y producción de biosurfactantes. ..6	
1.1 . Materiales y métodos	14
1.1.1 Microalgas	14
1.1.2 Mantenimiento y conservación del cepario	14
1.1.3 Tamizaje de tolerancia a hidrocarburos	15
1.1.4 Análisis con espectroscopia infrarroja	16
1.1.5 Caracterización molecular y análisis filogenético	16
1.1.6 Obtención de extracto liofilizado rico en biosurfactantes	19
1.1.7 Aumento de la producción de biosurfactantes en tratamientos de oscuridad .	19
1.1.8 Análisis con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) a partir de los extractos libres de células de los cultivos en oscuridad.	20
1.2 Resultados y discusión de resultados.....	21
1.2.1 Tamizaje de tolerancia a hidrocarburos	21
1.2.2 Espectroscopia infrarroja	22
1.2.3 Caracterización molecular y análisis filogenético	33
1.2.5 Obtención de extracto liofilizado rico en biosurfactantes	42
1.2.6 Aumento de la producción de biosurfactantes en tratamientos de oscuridad...43	
1.2.7 Análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) a través de desreplificación en la base de datos GNPS.	45
2. Análisis metabolómico del crecimiento heterotrófico de una microalga marina en presencia de petróleo.....60	
2.1 Materiales y métodos	63
2.1.1 Inoculo de la cepa algal	63
2.1.2 Obtención de cinética de crecimiento	63
2.1.3 Valoración de heterotrofia en presencia de petróleo	64
2.1.4 Obtención de extractos orgánicos.....	65
2.1.5 Análisis de lipidómica no dirigido con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	66
2.1.6 Detección, identificación y alineamiento de picos.	67
2.1.7 Filtración y normalización de los datos	67
2.1.8 Análisis estadístico multivariado	69
2.2 Resultados	70
2.2.1 Cantidad de extracto recuperado de los tratamientos	70
2.2.2 Matriz de picos obtenida en MZmine 2	71
2.2.3 Filtración y normalización de los datos	71
2.2.4 Análisis estadístico multivariado	73

Effect of crude oil on marine microalgae about heterotrophic growth and the production of extracellular metabolites	9
---	---

1.2.4 Obtención de cinética de crecimiento	79
3 Conclusiones y recomendaciones.....	82
3.1 Conclusiones.....	82

Introducción

La liberación al ambiente de una gran cantidad de sustancias contaminantes, se ha hecho extensa a medida que las actividades mineras e industriales aumentaron desde el siglo XIX. Razón por la cual el equilibrio de los ecosistemas marinos, se encuentra en una declinación seria (Hughes et al., 2005). La descarga de compuestos tóxicos recalcitrantes en el océano, ha conducido a la degradación de bahías y estuarios, en donde la contaminación de las columnas de aguas, sedimentos y organismos es el resultado de la explotación de los recursos y de actividades como la minería, extracción de hidrocarburos y el uso de agroquímicos (Samanta et al. 2002) (INVEMAR, 2010). Estos vertimientos constantes son capaces de alterar la integridad ecológica del medio marino (Islam & Tanaka, 2004); (Torres et al., 2008), su presencia conduce a largo plazo, a la pérdida de biodiversidad, lo que impacta en la sostenibilidad de los bienes y servicios de los ecosistemas (Hughes et al., 2005). Algunos contaminantes orgánicos, pueden ser de origen natural, cuando derivan de organismos vivos, pueden ser oxidados y biodegradados por otros organismos o pueden ser contaminantes orgánicos persistentes no biodegradables, cuya estructura de carbono los hace resistentes a la degradación ambiental por procesos químicos, biológicos o fotolíticos. Dentro de las propiedades de los contaminantes orgánicos persistentes, que los hace nocivos para los ecosistemas, se encuentran que son semi volátiles, presentan baja solubilidad en agua, tienen una toxicidad inherente y son lipofílicos (Priya et al., 2014). Entre las clases más predominantes, de contaminantes orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés), debido a su alta toxicidad, se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y los bifenilos policlorados (PCBs), pues se biomagnifican y bioacumulan en los ecosistemas

marinos, afectando la biología de muchos organismos (Cocci et al., 2018). Los PAHs están compuestos de dos o más anillos aromáticos, tienen amplia presencia en el suelo y los sedimentos marinos, debido al desarrollo de actividades industriales o por procesos naturales como vulcanismo o fumarolas. En Colombia el riesgo para los ecosistemas marinos es aún mayor, ya que año tras año se presentan derrames accidentales o provocados que afectan de forma directa los ecosistemas terrestres y acuáticos. Dentro del territorio, se realizan sabotajes a la infraestructura petrolera, siendo el detrimento a la red de oleoductos, una de las causas principales de las descargas de petróleo, sobre los ecosistemas marinos (Velásquez J., 2017).

La rehabilitación de un ecosistema, depende de la resiliencia ecosistémica, que opera a múltiples escalas dentro de éste, ésta es la capacidad que tienen los ecosistemas de rehabilitarse sin cambiar a estados alternos o degradarse lentamente, al absorber las perturbaciones humanas, continuas y las naturales, recurrentes (Hughes et al., 2005). Un mecanismo de resiliencia, dentro de los ecosistemas, son los microorganismos, puesto que tanto procariontas como eucariotas, al igual que sus asociaciones simbióticas, pueden contribuir a la biorremediación de ambientes contaminados, debido a que poseen una variedad de propiedades que les permite incorporar o asimilar, contaminantes orgánicos, al interior de sus células, durante sus actividades metabólicas degradándolos a componentes orgánicos menos tóxicos. Es bien conocida la capacidad de las microalgas para degradar compuestos orgánicos xenobióticos, como los PAHs (Carrera et al., 2010) (Romero et al., 2014) (Hamouda et al., 2016), en este sentido, la ficorremediación se define como el uso de algas para la remoción o biotransformación de contaminantes (Jadeja et al., 2012). Por su parte (Collins et al., 2014), la definen como los procesos en el que se usan estos organismos para secuestrar, remover, romper o metabolizar contaminantes del suelo o del agua.

Los microorganismos, tienen un rol geoactivo en la biósfera, usan compuestos como parte de los ciclos biogeoquímicos, colaborando con los procesos de

descomposición y la formación del suelo y el sedimento (Gadd, 2010) además, poseen adaptaciones fisiológicas y metabólicas que les permiten desarrollar tolerancia a ciertas condiciones adversas, modificando su maquinaria genética, logrando detoxificar o degradar contaminantes recalcitrantes que persisten en su ambiente (Shukla et al., 2014).

La pared celular es la primera barrera con la que las microalgas interactúan con su entorno, el papel fundamental de esta superficie celular, radica en que es una barrera potencial, para evitar la entrada de contaminantes hacia los compartimentos internos, manteniendo un tamaño de poro adecuado. Al considerar el efecto protector de la pared celular externa, se debe también considerar la importancia de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), ya que estas actúan como escudo para las células algales, es importante resaltar que los EPS contienen varios grupos funcionales, lo que les da el potencial de interactuar con diversas sustancias, alterando su biodisponibilidad y toxicidad, por lo que se debe enfatizar en su rol ecológico, para la degradación o transformación de los contaminantes (Zheng et al., 2019). La acumulación o liberación de estos compuestos ayuda a las microalgas a sobrevivir bajo condiciones extremas o adversas de su entorno, es decir, les permiten adaptarse (Paliwal et al., 2017).

Los procesos metabólicos algales se ven muy influenciados por la iluminación, (Smith & Underwood, 2000) sostienen que cuando las células de varias microalgas se incuban en oscuridad, la producción de EPS aumenta. La biosíntesis de estos metabolitos puede ser inducida por estresores abióticos como temperatura, salinidad, radiación UV y limitantes nutricionales, de esta manera, bajo estas condiciones, estos metabolitos les permiten adaptarse y sobrellevar el estrés biótico o abiótico (Paliwal et al., 2017). Las aplicaciones potenciales de estos metabolitos extracelulares han generado una búsqueda global de estrategias para su explotación eficiente, por lo que el estrés abiótico tiene un rol central. Por otro lado, los biosurfactantes, un tipo de sustancia polimérica extracelular, son macromoléculas anfipáticas producidas principalmente por microorganismos cuya función es solubilizar compuestos orgánicos hidrofóbicos (ejemplo los

hidrocarburos) a través de la formación de micelios o microemulsiones entre diferentes fases, facilitando así, su ingreso a las células (biodisponibilidad), estas propiedades se ven reflejadas y/o pueden ser medidas al disminuirse la tensión superficial en los medios de cultivo celulares. Los surfactantes algales son de naturaleza lipídica y se clasifican como glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos y lipopolisacáridos (Paniagua et al., 2014).

Estudios en especies de microalgas, en los últimos años, han empezado a usar enfoques ómicos, con el fin de mejorar la comprensión de sus procesos metabólicos (Guarnieri et al., 2011). A través de la aproximación a los sistemas biológicos con herramientas como la transcriptómica, proteómica y metabolómica, se ha podido comprender cómo los microorganismos responden y se adaptan a los cambios en su entorno físico, en especial, la metabolómica se enfoca en el estudio de las moléculas orgánicas que intervienen en los procesos celulares, como por ejemplo en procesos de biorremediación. En esta línea de ideas, (Olmos et al., 2012) describieron el desarrollo y validación de una metodología analítica adecuada para medir cantidades pequeñas de benzo [a] pireno y otros metabolitos producidos en bioensayos con la microalga *Selenastrum capricornutum*, esta metodología se basó en el análisis de extractos extracelulares con cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de fluorescencia (HPLC-FD). Por su parte (Giraldo et al., 2021), a través de un análisis del perfil lipídico o lipidoma, evaluaron la respuesta metabólica de la microalga *Botryococcus braunii*, al disminuir las concentraciones de magnesio Mg^{2+} , este estudio se basó en el uso de una cromatografía líquida de alto rendimiento ligada a un espectrómetro de masas (UPLC-MS).

Con el contexto anterior, el presente proyecto buscó seleccionar e identificar molecularmente, a partir de una colección de microalgas marinas, previamente aisladas de la bahía de Santa Marta, al menos tres estirpes que fueran capaces de tolerar el petróleo y detectar / comparar la presencia de biosurfactantes en el medio extracelular empleando herramientas metabolómicas, además de evaluar la

producción de estas sustancias por la microalga más tolerante, bajo condiciones de incubación de luz y oscuridad. La justificación del proyecto radica en que comparar los metabolitos extracelulares generados permitirá aproximarse a las dinámicas diferenciales de degradación, entre las zonas con una incidencia de luz desigual, como es el caso de las zonas templadas y polares, en las que la iluminación solar es inconstante a lo largo del año, en contraste con el trópico. Se espera que el crecimiento de la microalga tolerante seleccionada bajo condiciones quimioorganoheterótroficas, potencie la producción de sustancias biosurfactantes, al exponerse en un medio con petróleo, lo que favorece la tolerancia, estimulando la asimilación o transformación de los PAHs.

1. Microalgas marinas tolerantes a petróleo y producción de biosurfactantes.

Resumen

En la biorremediación, la capacidad de las células microalgales, para remover o biotransformar contaminantes orgánicos complejos como el petróleo, se ve facilitada por la producción de metabolitos extracelulares como los biosurfactantes que disminuyen la tensión superficial al repartirse en la interfase agua - petróleo. Por estas razones, en este estudio se realizaron bioensayos de tolerancia a petróleo, en suspensión al 1 %, empleando cinco microalgas marinas aisladas del Caribe colombiano. Al cabo de un mes de exposición, se obtuvieron extractos extracelulares de las microalgas que exhibieron la capacidad de crecer en presencia del petróleo. Estudios moleculares usando el marcador 18S rARN realizados a tres de las microalgas empleadas en el tamizaje, identificaron las estirpes como haplotipos, con 125 sitios polimórficos, 69060 forma un clado monofilético con *Nannochloris sp.* (OQ096682) y en una relación de clados hermanos se alinearon 69061 y 69055, al igual que la secuencia de la especie tipo, recientemente reportada como *Nomia picochloropsia* (OK641940). Análisis con espectroscopía infrarroja (FTIR) de los tratamientos del tamizaje indicaron cambios en la estructura del petróleo y en los extractos extracelulares de la microalga con código 69060, la presencia de una sustancia con perfil biosurfactante. Se completaron metodologías de extracción dirigida a la obtención de biosurfactantes lipídicos y a su análisis con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para caracterizar parcialmente el compuesto detectado. Se encontró coincidencia con la plipastatina, un compuesto con actividad antimicrobiana, reportado en bacterias. Los resultados obtenidos, fomentan la bioprospección de estos microorganismos, como una fuente alternativa para la explotación de estos compuestos, a partir de la amplia biodiversidad marina de nuestros océanos que ha sido poco estudiada.

Palabras clave: polución, biosurfactantes, FTIR, biodiversidad, petróleo, tolerancia.

Introducción

La biodiversidad encontrada en el entorno marino representa una amplia fuente para el aislamiento de nuevas moléculas bioactivas a partir de microorganismos como microalgas, cianobacterias, bacterias, hongos, e invertebrados marinos, moléculas que tienen un rol sobre ellos mismos como en el ambiente. En los últimos treinta años se han identificado nuevos compuestos interesantes en el entorno marino con un amplio valor agregado en diferentes campos, denominados productos naturales marinos como lo indica (Talero et al., 2015a).

Químicamente, los hidrocarburos que componen el petróleo se pueden dividir en fracciones de carbono alifáticas, cíclicas y aromáticas, que tienen diferentes propiedades y toxicidades. La fracción alifática o de cadenas lineales incluye alquenos, alcanos y los cíclicos, mientras que la fracción aromática abarca hidrocarburos monoaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), que se conocen como el constituyente más tóxico por su potencial carcinogénico y teratogénico (Xaaldi et al., 2017). Por estas razones los derrames de petróleo en los ecosistemas marinos son uno de los principales factores con efectos adversos prolongados sobre la vida marina, ya que resultan ser de alto riesgo ecológico y una amenaza latente para la conservación de las especies, al inducir mutaciones y pérdida de diversidad genética, con implicaciones para la supervivencia a largo plazo de las poblaciones naturales (Fernández et al., 2011). Este panorama es aún

más crítico en las especies que se encuentran amenazadas como es el caso de la tortuga *Caretta caretta* (Cocci et al., 2018). Paralelamente, se tiene conocimiento que algunas especies de microalgas pueden vivir en ecosistemas impactados por derrames de petróleo (Olivares et al., 2018) exhibiendo así la capacidad de tolerar la presencia de esta sustancia contaminante en su entorno. Dichos autores aislaron la diatomea *Halamphora oceanica* del golfo de México, que ha sido impactado por dos grandes vertimientos y la expusieron a diferentes concentraciones de petróleo 0.01, 0.1, 1 y 10 g/L. Por su parte (Carrera et al., 2010) indican que los organismos son capaces de sobrevivir en ambientes contaminados como resultado de dos procesos alternativos, la aclimatización fisiológica resultado de la modificación en la expresión génica o la adaptación genética debida a mutaciones que confieren resistencia. Dichos autores realizaron un análisis de los efectos tóxicos a corto y largo plazo de muestras de petróleo del vertimiento *Prestige*, en cultivos de la microalga *Dunaliella tertiolecta*, para lo cual desarrollaron un análisis de fluctuación usando el petróleo, como el agente selectivo, así pudieron determinar las células resistentes que se aclimataron fisiológicamente al petróleo del *Prestige* y las células resistentes a partir de las mutaciones espontáneas que ocurren azarosamente previo a la exposición de crudo. Los investigadores usaron unas concentraciones de petróleo en el medio de cultivo de 1:1000, 1:100 y 1:20 (peso de petróleo: volumen del medio de cultivo). Adicionalmente (Romero et al., 2014) estudiaron un caso extremo de contaminación con petróleo, en el arroyo del río minero en Argentina, donde debido a la exploración se ha estado vertiendo petróleo desde 1915, los autores lograron aislar dos especies de microalgas que viven en contacto directo con el petróleo, *Scenedesmus obtusus* y *Scenedesmus sp. cf. rapaportii*, las cuales fueron mantenidas en condiciones de laboratorio que permitieran un balance entre una intensidad de selección fuerte, con la adición del 1 % del petróleo al medio, para lograr el mantenimiento de un tamaño poblacional suficientemente grande para incrementar la probabilidad de mutaciones espontáneas que confirieran la adaptación al petróleo. Por lo anterior, podemos constatar que los

requerimientos nutricionales de las microalgas son muy diversos. Algunas necesitan concentraciones significativas de micro y macronutrientes entre estos nitrógeno, fósforo y potasio (Kandimalla et al., 2016), con respecto a esto autores como (Olivares et al., 2018) y (Carrera et al., 2010) reportan que en el desarrollo de experimentos a exposición a petróleo, los requerimientos nutricionales logran ser proveídos por el medio de cultivo F/2 según (Guillard R., 1975). Varias especies de microalgas, a pesar de ser productoras primarias tienen la capacidad de consumir carbono como fuente de energía, siendo así consideradas heterótrofas facultativas, exhibiendo versatilidad y flexibilidad metabólica, lo que les permite adaptar su metabolismo a diferentes condiciones de cultivo. Actualmente, se reconoce que algunas microalgas que eran consideradas fotoautótrofas estrictas en realidad pueden crecer en condiciones heterotróficas, de manera secuencial o simultánea. Se sabe de la capacidad que poseen algunas microalgas dentro del clado *Chlorophyta*, con morfología cocoidal, como *Nannochloropsis* sp. y *Chlorella* sp., de crecer bajo condiciones mixotróficas y/o heterotróficas (Poddar et al., 2018). De esta manera, se pueden modular las condiciones del cultivo, para tener control sobre la formación de compuestos blanco (Bumbak et al., 2011). Por lo tanto, en modo heterótrofo la materia orgánica es utilizada por la respiración de las células microalgales sin luz. En modo mixotrófico, la microalga puede convertir la energía solar a energía química capturando la luz disponible y dirigiendo la fijación del CO₂ por la fotosíntesis y asimilar simultáneamente compuestos orgánicos por la respiración aeróbica (Chang et al., 2022), (Kandimalla et al., 2016) (Subramanian et al., 2016). Así, se puede aumentar y/o inducir la producción de compuestos blanco, además de lograr una producción eficiente de biomasa sin luz (Bumbak et al., 2011), lo que puede conllevar a la mejora de procesos de biorremediación. La inducción de crecimiento heterótrofo, en ausencia de luz, ligada a la producción de metabolitos de interés, conlleva a la disminución de limitaciones de tipo económico que se presentan al producir sustancias y/o compuestos bioactivos con valor agregado, en comparación con los cultivos que requieren iluminación constante (Khan et al., 2016).

Bajo este contexto la fitorremediación se proyecta en un sentido amplio, como un tipo de biorremediación, con el uso de macroalgas o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes (Jadeja et al., 2012; Xaaldi et al., 2017). Por lo tanto, los cultivos algales proveen un biotratamiento de los desechos industriales menos impactante para el ambiente, en comparación con tratamientos químicos, esto ligado a la producción de biomasa potencialmente valiosa para la extracción de compuestos con actividad biológica, como es el caso de los biosurfactantes, cuya fracción polar puede ser anfóterica, no-iónica o iónica y que les permite tener características como la baja tensión superficial y la emulsión eficiente de los hidrocarburos, incrementando la solubilidad del petróleo, facilitando así su traspaso a través de la membrana y potenciando su degradación (Reddy et al., 2023a). Los surfactantes algales son de naturaleza lipídica y se clasifican como glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos y lipopolisacáridos; tal como lo indica (Elisângela et al., 2015), para la producción de biosurfactantes se emplean microalgas porque estos microorganismos son los mayores productores de estas sustancias de naturaleza lipídica. Los glicolípidos son lípidos complejos, presentes en mayor medida en plantas y cianobacterias, donde se localizan en las membranas de los tilacoides en los cloroplastos. En eucariotas, también están presentes en la superficie externa de la membrana celular para reconocimiento como para proveer energía o estabilidad (Talero et al., 2015). Autores como (Parrish et al., 1998) reportaron la producción de glicoglicerolípidos con actividad hemolítica en la microalga *Gymnodinium mikimotoi*, por su parte (Hossain et al., 2005) indican que el alga *Sargassum horneri* es fuente de glicolípidos con potencial antitumoral por su inducción de la apoptosis. (Hiraga et al., 2008) reportaron tres nuevos glicolípidos en el dinoflagelado marino *Heterocapsa circularisquama* con actividad hemolítica, involucrados en la toxicidad masiva observada sobre cultivos de bivalvos. (Xu et al., 2010) reportaron producción del glicerolípidos fotosintéticos en la diatomea marina *Stephanodiscus sp.*, asociados con la estabilización de la bicapa en la membrana, estando así relacionados con la habilidad que exhiben

estos microorganismos de adaptarse a condiciones ambientales extremas adicionalmente poseen diferentes actividades biológicas. Por su parte los lipopéptidos son compuestos cíclicos o lineares, de bajo peso molecular, compuestos de fragmentos de ácidos grasos conectados con péptidos a través de un enlace éster (Dembitsky, 2022), tienen un gran potencial antimicrobiano y poseen varias actividades biológicas, como antiinflamatorios o citotóxicos. Por estas razones, estos productos metabólicos, bioactivos son aplicables en un gran número de industrias y procesos como, farmacología y bioremediación de ambientes contaminados o degradados (Paniagua et al., 2014) y representan una alternativa al uso de surfactantes de origen químico, no biodegradables, que pueden llegar a ser tóxicos. Estos péptidos modificados se han descrito predominantemente en cianobacterias marinas, donde representan el 40 % de los compuestos bioactivos hasta ahora descritos, como es el caso del lipopéptido cíclico reportado en *Moorea producens* con actividad antiparasitaria (Almaliti et al., 2017) o el lipopéptido cíclico producido por *Symploca cf. hydroides* reportado por (Salvador et al., 2011) que exhibe actividad citotóxica contra células del adenocarcinoma colonorectal. Paralelamente, (Nogle et al., 2001) aislaron un lipopéptido neurotóxico a partir de la cianobacteria *Lyngbya majuscula* con una estructura similar a la de una neurotoxina. (Wrasidlo et al., 2008) describieron la actividad y el mecanismo de acción de un lipopéptido derivado de la cianobacteria *Lyngbya majuscula*, que induce apoptosis en tumores y células endoteliales angiogénicas. Adicionalmente también se ha descrito la presencia de estas moléculas en representantes del género *Nostoc sp.*, *Schizothrix sp.*, y *Hassallia sp.* (Dembitsky, 2022; Luesch et al., 2000). (Iwasaki et al., 2015) reportaron dos lipopéptidos nuevos que fueron aislados del alga verde *Derbesia marina*.

En el contexto nacional este es el primer reporte, del que se tiene conocimiento, de una caracterización preliminar a través del desarrollo de una metodología de FTIR-ATR simultánea con LC – MS/MS de un extracto lipofílico, libre de células, obtenido de un entorno en el que una microalga marina es expuesta a la presencia de petróleo en el medio, con el fin de vislumbrar la presencia de metabolitos

extracelulares que le permiten a estos microorganismos tolerar la presencia del contaminante.

Los cambios sobre los grupos funcionales del petróleo fueron monitoreados con FTIR-ATR. La espectroscopia infrarroja irradia las moléculas con luz infra roja obteniendo así información sobre las frecuencias características de cada molécula, permitiendo perfilar un compuesto químico (Karlapudi et al., 2018). (Sitachitta et al., 2000) reportaron el uso de una metodología FTIR como parte de los procedimientos experimentales generales realizados para la caracterización de dos nuevos lipopéptidos que presentaron bandas fuertes de absorción en los números de onda de 1732 y 1661 cm^{-1} , que indican la presencia de los grupos funcionales éster y amida, grupos funcionales que se encuentran muy relacionados con los productos naturales marinos. Por su parte (Fernandes et al., 2020) indican que realizaron el análisis de los extractos lipofílicos obtenidos con cloroformo, a partir de la microalga *Pavlova pinguis* usando espectroscopia infrarroja con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), escaneando sobre un rango de número de onda de 4000 – 650 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . Dentro de las metodologías que se reportan para realizar estudios lipidómicos en especies de microalgas se encuentra el uso de metodologías como cromatografía líquida de alto rendimiento (UHPLC), cromatografía de interacción hidrofílica ligada a espectrometría de masas de alta resolución (HILIC - LCHRMS) y resonancia magnética nuclear (NMR) (Reddy et al., 2023b). Adicionalmente, (Patiño et al., 2021) reportaron el uso de metodologías con FTIR- ATR para la caracterización preliminar de los grupos funcionales encontrados en extractos de naturaleza lipídica, con perfil biosurfactante provenientes de bacterias aisladas de sedimentos marinos.

En cuanto a la identificación molecular, como lo indican (Lortou et al., 2022), la diversidad de los microeucariotas fotosintéticos está subestimada y el conocimiento de sus relaciones filogenéticas y taxonómicas es deficiente, razón por la cual, el uso de esta herramienta ha permitido reconstruir las relaciones filogenéticas dentro

de un phylum tan diverso como lo es el Chlorophyta. La implementación de métodos filogenéticos ha conllevado al descubrimiento de nuevas taxas cada año, debido a que es un linaje que divergió muy tempranamente de Viridiplantae y es muy diverso morfológica, citológica y ecológicamente (Lortou et al., 2022). Se presenta una variabilidad alta de algunas de las características observables de las especies y la plasticidad fenotípica que muchos de estos microorganismos exhiben, deja un gran número de dificultades para la delimitación de las especies. Igualmente, está claro que la gran mayoría de los estudios a nivel mundial, han investigado en mayor medida la diversidad de las macroalgas Chlorophyta y los estudios en las microalgas están limitados a descripciones morfológicas o al reconocimiento del estatus ecológico de su ecosistema. Razón por la cual realizar esta identificación molecular permitiría adjudicar la habilidad de producir estas sustancias biosurfactantes en presencia de petróleo, a un clado específico dentro de la división de algas verdes unicelulares Chlorophyta. Como lo indican (Temraleeva et al., 2022) esta morfología relativamente simple encubre una gran diversidad ecológica, fisiológica y filogenética. Estos autores también indican que los estudios recientes basados en secuencias nuevas del 18S rRNA, han mostrado que *Nannochloris* es un género polifilético, por lo que es necesario ahondar en la clasificación de las algas verdes cocoidales. La combinación de un enfoque clásico, basado en morfología y una aproximación molecular, en la clasificación taxonómica, brinda resultados más robustos. A través de la incorporación simultánea, en la clasificación, de las características morfológicas y ultraestructurales, de los tipos de reproducción y hábitats, al igual que las diferencias en el gen 18S rRNA, la estructura secundaria ITS2 y la región de la subunidad larga del gen *rbcL* de las especies estudiadas, se han renombrado y propuesto nuevos géneros.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue seleccionar a partir de una colección de microalgas, estirpes que toleraran el petróleo en solución al 1% y en cuyos extractos orgánicos se detectará la aparición de nuevos grupos funcionales, que fueran indicativos de la producción de sustancias con perfil biosurfactante. Al igual

que identificar molecularmente las estirpes que mostraron la capacidad de tolerar la presencia del petróleo en su entorno y detectar los compuestos tipo biosurfactante producidos durante el crecimiento heterotrófico, en medio mínimo de sales, mediante análisis FTIR y LC-MS/MS.

1.1 . Materiales y métodos

1.1.1 Microalgas

Para el desarrollo de este estudio, se emplearon cinco especímenes de la colección del museo de Historia Natural Marina de Colombia – Makuriwa (números consecutivos museo Makuriwa 69055, 69057, 69059, 69060, 69061), ubicado en la sede principal del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, INVEMAR. Bajo el contrato marco de acceso a recurso genético No. 123 del ministerio de medio ambiente, expediente RGE 0158-5. Dichas microalgas fueron aisladas previamente a partir de muestras de la columna de agua, de un ambiente somero, de la zona marino costera de Santa Marta, Colombia, puntualmente de la bahía de Taganga, la bahía de Chengue y la bahía de Nenguange

1.1.2 Mantenimiento y conservación del cepario

El mantenimiento del cepario se realizó por transferencia periódica, al igual que lo indican en la CCAP (2014) - The Culture Collection of Algae and Protozoa - (CCAP, 2014). Para esto, se realizó mensualmente la renovación del medio de cultivo líquido y sólido F/2 de cada una de las cepas, con el fin de mantenerlas en óptimas condiciones metabólicas. Los pases permanecieron en una incubadora tipo Revco, a $22,5^{\circ} \text{C} \pm 0,5$ y los cultivos en medio líquidos se mantuvieron en agitación constante a 130 rpm, bajo iluminación permanente; el revco está dotado de tubos de lámparas fluorescentes de luz blanca, que emiten una intensidad de luz de aproximadamente $30 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el anexo A se relaciona la tabla (A1)

que indica la composición y preparación del medio enriquecido F/2 empleado, según (Guillard, 1975).

1.1.3 Tamizaje de tolerancia a hidrocarburos

Previo al desarrollo de los bioensayos se examinaron directamente los cultivos usando un microscopio óptico, como lo recomienda (Carrera et al., 2010). Para la caracterización microscópica de las células, se utilizó una solución de lugol, una solución Transeau y el medio de cultivo F/2, con el fin de identificar y contrastar las características y estructuras internas típicas de cada una de las especies, visibles de manera diferencial en dichas soluciones. El uso de estas soluciones permite el reconocimiento de características morfológicas como la forma de la célula, la posición de los cloroplastos, la presencia o ausencia de pirenoides, que se ven como zonas diferenciadas pero no pigmentadas de los cloroplastos. En el phylo *Chlorophyta*, los plastos se colorean de yodo debido a que almacenan almidón y se ven verdes.

Seguidamente se realizaron bioensayos con exposición a petróleo al 1% (v/v), por triplicado, de cinco microalgas marinas, las cuales fueron cultivadas en Erlenmeyers de 50 mL, con 20 mL de medio salino enriquecido F/2 como lo indican (Olivares et al., 2018) y (Carrera et al., 2010), preparado con agua de mar microfiltrada, a través de un sistema que incorpora luz UV y filtros con un tamaño de poro de 5 y 1 μm . El medio de cultivo fue suplementado con 200 μL de petróleo. El petróleo fue esterilizado con luz UV, durante 1 semana (Ayala & Dussán, 2018). Se inoculó una alícuota de 0,5 mL proveniente de un cultivo líquido de 24 horas, de cada una de las microalgas. Los bioensayos se incubaron a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en agitación constante a 130 rpm y en iluminación fluorescente persistente dentro de una incubadora tipo Revco. El bioensayo de exposición de la microalga con código 69060 se realizó de forma simultánea bajo condiciones de luz y oscuridad, con el fin de inducir crecimiento heterotrófico (Poddar et al., 2018). Estos bioensayos se incubaron durante 30 días. Se realizaron dos controles, el control del medio de cultivo incubado bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura, que

contenía solo medio de cultivo y 200 μL de petróleo y un control de crecimiento, para las cinco estirpes, en el que se incubaron 0,5 mL de un cultivo de 24 horas, de cada microalga, en 20 mL del medio de cultivo F/2, sin el petróleo.

1.1.4 Análisis con espectroscopia infrarroja

Se realizaron análisis FTIR de los cultivos del tamizaje (numeral 1.1.3). Al terminar el tiempo de incubación (30 días), los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm, durante 30 min, a 4°C, luego se tomaron muestras de la biomasa que se encontraba formando flóculos con el petróleo residual, a partir de los sobrenadantes libres de células y se liofilizaron, para ser analizadas. Se utilizó el espectrofotómetro infrarrojo marca Shimadzu, modelo IR Tracer-100, dotado de un accesorio de reflexión horizontal ATR (ATR - MIRacle™ PIKE) y con un detector DLATS. Cada espectro fue corrido con un promedio de 64 barridos y, con una resolución de 8 cm^{-1} , en las longitudes de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} (infrarrojo medio). La asignación de señales se realizó teniendo en cuenta la tabla de espectroscopía infrarroja de Sigma Aldrich (Merck, 2019) y utilizando la magnitud de número de onda ($1/\lambda$), la cual hace referencia al número de veces que vibra una onda por unidad de distancia. Como control negativo, se obtuvo el espectro infrarrojo del petróleo, el cual fue obtenido después de incubarlo bajo las mismas condiciones de crecimiento que las microalgas, en agitación constante e iluminación permanente, con el fin de determinar las bandas características, en intensidad y frecuencia, para así identificar los cambios y transformaciones en la estructura química del petróleo en el momento final del tratamiento, a los 30 días de cultivo. En el anexo C6, se pueden observar los dos espectros FT- IR tomados a dos réplicas del control negativo.

1.1.5 Caracterización molecular y análisis filogenético

Se realizó la identificación molecular de tres microalgas que toleraron la presencia del petróleo en solución al 1% (v/v) (numeral 1.2.3). Para obtener el ADN genómico de las estirpes que se encontraban en medio sólido, en placas de diez días de

incubación, se empleó el kit GF-1 Tissue DNA extraction (Vivantis Technologies), bajo las recomendaciones sugeridas por el fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado empleando el espectrofotómetro de microgota Nanodrop 2000 de Thermo Scientific, a partir de 2 μ L de muestra.

Se emplearon dos cebadores uno que generaba un tamaño de amplicon > 1000 pb según (Tale et al., 2014) y otro que flanqueaba en el locus interno V4, la región variable, de la secuencia 18S y generaba un fragmento < a 550 pb, según (Zimmermann et al., 2011)

Las secuencias de los cebadores empleados se encuentran en la Tabla 1. Se llevaron a cabo reacciones de PCR para cada par de cebadores probado. Las reacciones de amplificación de PCR se realizaron en tubos Eppendorf de 200 μ L, usando 13,5 μ L de agua milli Q, 0,04 (U/ μ L) de la Polimerasa Platinum TM TaqDNA y 1 μ L del buffer, se usaron 0,2 μ M de cada par de cebadores y 2 μ L del ADN genómico extraído, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂. Cada mezcla de reacción tenía un volumen final de 25 μ L. Se estableció el siguiente ciclo térmico, en el termociclador (BioRad T-100), desnaturalización a 95°C, por 5 min, 35 ciclos de amplificación así, 35 segundos a 94°C para desnaturalización, 55°C durante 45 segundos para alineamiento, 72°C por 1 min como ciclo de extensión, con una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron por separación de electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) y se usó como agente intercalante 2 μ L de FloroVue Nucleic Acid Stain (SMOBIO). Los amplicones se purificaron preliminarmente incubándolos a 37°C durante 20 minutos con las enzimas Exonucleasa I (EXO I, 0,5 μ L) y fosfatasa alcalina de Cameron (Rsap, 1 μ L), seguido de una inactivación enzimática a 80°C por tres minutos. Posteriormente, los fragmentos obtenidos fueron secuenciados por secuenciación capilar empleando el analizador genético SeqStudio en el Laboratorio de Biología molecular y celular de la Universidad Nacional sede Medellín. Fueron usados los reactivos (kit BIGDYE TERMINATOR V.3.1 CYCLE SEQUENCING KIT, kit BigDye® X Terminator™) y protocolos del fabricante. Se verificó la calidad de las secuencias y se removieron las bases con baja calidad empleando los programas

Geneious Prime v2023.1.1 y Bioedit v7.2.5. Los dos amplicones se alinearon para obtener una secuencia consenso larga y posteriormente, se buscaron homologías en la base de datos del NCBI con las secuencias consenso que se obtuvieron, usando el algoritmo del BLASTn, (basic local alignment search tool, por sus siglas en inglés) como lo recomiendan (Tale et al., 2014). Teniendo en cuenta el criterio de máxima afinidad ($\geq 91\%$), como lo recomienda (Khaw et al., 2020) se seleccionaron las secuencias para la construcción de la relación filogenética. El alineamiento múltiple, de las secuencias seleccionadas se realizó usando MAFFT v7.505 (Kato & Standley, 2013), utilizando la estrategia “auto” y el modo de alineación normal. Y fue empleado Gblocks 0.91b (Talavera & Castresana, 2007) para eliminar los fragmentos que se alinearon ambiguamente, utilizando como parámetros de configuración: número mínimo de secuencias para una posición conservada / de flanco (16/16), número máximo de posiciones contiguas no conservadas (8), longitud mínima de bloque (10), posiciones de hueco permitidas (con la mitad). El mejor esquema de partición y los mejores modelos evolutivos para las particiones predefinidas se seleccionaron usando PartitionFinder2 v.2.1.1 (Lanfear et al., 2017) con el algoritmo y el criterio AICc. En la tabla 2 se presenta la lista de secuencias usadas. Finalmente se construyó un árbol filogenético utilizando máxima verosimilitud con el programa IQ-TREE V2.2.0 (Nguyen et al., 2015) bajo el modelo para 20000 ultrafast bootstraps (Minh et al., 2013), también se empleó la prueba Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood-ratio (Guindon et al., 2010). Paralelamente, se construyó un árbol filogenético inferencia bayesiana empleando MrBayes v3.2.7s (Ronquist et al., 2012), bajo el modelo de partición (dos ejecuciones paralelas, 5000000 generaciones), en el que el 25 % inicial de los datos muestreados se descartaron como burn-in. Los árboles filogenéticos obtenidos fueron visualizados con FigTree v1.4.3.

Tabla 1. Secuencias de los pares de cebadores usados que amplifican diferentes zonas del rARN 18S

Nombre	Secuencia 18 S FORWARD	Secuencia 18S REVERSE	Autores
--------	------------------------	-----------------------	---------

18S-F y 18S-R	5'-CCAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'	5'-CCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCT-3'	(Tale et al., 2014)
R y F	5'-TCC AGC TCC AATAGC GTA-3'	5'-TCT TTA AGT TTC AGC CTT GC-3'	(Zimmermann et al., 2011)

1.1.6 Obtención de extracto liofilizado rico en biosurfactantes

A partir de los tratamientos del screening de la microalga 69060 (numeral 1.1.3), realizados en F/2 suplementado con petróleo al 1%, después de 30 días de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm por 15 min para obtener un sobrenadante libre de células. Las muestras de las seis unidades experimentales, tres incubadas en luz y tres en oscuridad, se consolidaron en una única muestra, con el fin de aumentar la recuperación del extracto orgánico. El sobrenadante, se sometió a precipitación ácida usando HCl 6 M, hasta alcanzar un pH cercano a 2,0 y se almacenó a 4°C, durante 24 h. El precipitado fue recolectado por centrifugación durante 30 min a 4000 rpm, recuperando el pelet y sometiéndolo a lavados con HCl 0,1 M. Luego se disolvió en agua destilada, ajustando el pH a 8,0 y se liofilizó. Finalmente se extrajo el compuesto con una mezcla de 65 mL de cloroformo y 15 mL de metanol y se concentró por rotavaporación a presión reducida. Luego se pesó la cantidad de extracto recuperado para calcular un porcentaje de producción, relacionando el peso del extracto, dividido en el volumen del cual se extrajo multiplicando esta relación por 100. Este procedimiento es el empleado para obtener biosurfactantes lipídicos

1.1.7 Aumento de la producción de biosurfactantes en tratamientos de oscuridad

Con el fin de aumentar la producción y la cantidad del extracto recuperado, rico en moléculas anfipáticas, a partir de los bioensayos de la microalga 69060, de la cual fue posible extraer un compuesto con naturaleza biosurfactante, se realizaron cultivos en un volumen mayor. Fueron realizados seis cultivos, con un volumen de trabajo de 200 mL, que fueron agrupados para un total de 1,2 L, para la precipitación de biosurfactantes como se indica en la sección 1.1.7. Para ello en 200 mL de medio de cultivo F/2, suplementado con 2 mL de petróleo fueron

inoculados 2 mL de inóculo algal, provenientes de un cultivo líquido de 24 horas, que se encontraba a una concentración promedio inicial de $6,74 \times 10^6$ células/mL. Debido a que se había observado en los espectros FTIR – ATR, que esta microalga tenía picos más pronunciados en los tratamientos en oscuridad, estos tratamientos de exposición fueron desarrollados en un agitador orbital, sin iluminación (numeral 1.2.2). Después de 30 días de incubación, el tratamiento finalizó, y se procedió a obtener un fermento libre de células, a partir de un volumen total de 1.2 L, para aplicar la metodología anteriormente descrita (numeral 1.1.7). Con fines comparativos, para los tratamientos de 20 mL de la microalga 69060 (numeral 1.1.3), a partir de un volumen total consolidado de 120 mL, proveniente de los seis Erlenmeyers de 20 mL, de los seis cultivos, tres incubados en luz y tres en oscuridad, y para los tratamientos de 200 mL, a partir de un volumen total consolidado de 1,2 L, se calculó una relación entre la cantidad de extracto seco recuperado sobre el volumen de medio de cultivo empleado para hacer la extracción.

1.1.8 Análisis con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) a partir de los extractos libres de células de los cultivos en oscuridad.

Con el propósito de caracterizar parcialmente el extracto rico en biosurfactantes obtenido a partir de los cultivos realizados en condición de oscuridad, se le realizó un perfilamiento con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas como lo indica (Patiño et al., 2021). Las corridas de LC-MS/MS se realizaron en el laboratorio de química orgánica de productos naturales de la Universidad de Antioquia empleando un UHPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 ligado con HRMS (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, USA), equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI). El sistema de cromatografía usó una columna analítica C18 (columna LC Kinetex tamaño de partícula $1.7 \mu\text{m}$, $100 \times 2.1 \text{ mm}$). La fase móvil fue un sistema de solvente binario que consistía de A (agua, 0.1% FA)

y B (ACN, 0,1% FA). La condición de elución fue un gradiente discontinuo así: 10 % B por 5 min, 10-70 % B por 7 min, 70 % B por 5 min, 70-99% B por 4 min y 99% de B por 6 min. El volumen de inyección fue 1 μ L, la tasa de flujo fue 0.4 mL/min. Las ionizaciones se adquirieron en modo del ion positivo usando un electrospray de ionización para espectrometría de masas (ESI-MS) con temperatura capilar, el voltaje se ajustó a 3.5 kV en 200°C, respectivamente. La oscilación del scanner fue en un rango de masa/carga desde 50 m/z a 1200 m/z. Para el procesamiento de los datos crudos obtenidos, se usó el software MZmine. Los espectros obtenidos se procesaron en la base de datos GNPS (Global Natural Products Social molecular Networking) del Centro computacional de espectrometría de masas (CCMS) en la Universidad de San Diego, la UCSD, que es un gran reservorio de datos de espectrometría de masas en productos naturales. La cual fue desarrollada con el fin de suplir la necesidad de una plataforma comunitaria, análoga al NCBI o UniProt, que permitiera compartir y analizar datos de espectrometría de masas (Wang et al., 2016).

1.2 Resultados y discusión de resultados

1.2.1 Tamizaje de tolerancia a hidrocarburos

En los tratamientos de las cinco microalgas evaluadas en el tamizaje, con petróleo al 1% en suspensión, se evidencio tolerancia a la presencia del estresor en el medio. Durante el tamizaje, para las cinco microalgas, se pudo observar que el petróleo se compactaba progresivamente durante la primera parte del tratamiento; es decir los primeros quince días. Al final del ensayo, a los treinta días, en los tratamientos de las microalgas con códigos 69057, 69059, 69060, 69061, se formó un flóculo, entre la biomasa y el crudo, que no tenía consistencia ni apariencia de petróleo, como se puede apreciar en las figuras del anexo C1, C2 y C3. Después de 18 días de incubación, en el tratamiento de la microalga 69055, el flóculo que se había formado se deshizo y el petróleo quedó nuevamente en solución de manera disgregada, como se observa en la figura del anexo C4, en el que se

observa la muestra compuesta proveniente de las tres réplicas del tratamiento de exposición. En la figura del anexo C3 A., que corresponde al control negativo del screening, el cual fue sometido a las mismas condiciones de iluminación y agitación que los tratamientos, se puede observar, que no se presenta compactación del petróleo, no se evidencia formación de flóculos, ni hay ningún tipo de coloración en el medio de cultivo como en el control positivo o incluso una coloración con tonalidad café, como la que se observó al final del tratamiento de la microalga 69055, anexo C4. Debido a la ondulación generada durante la agitación constante, en el control negativo el petróleo se ve, en su mayoría sobre las paredes del Erlenmeyer, en la figura C3 A., otra diferencia con los tratamientos de exposición de las microalgas 69060 y 69055, pues como se observa en el anexo C1, C2 y C4, al final de los tratamientos no se observa petróleo sobre las paredes de los Erlenmeyers. En las fotografías del anexo C1 se puede observar que en el tratamiento de la microalga 69060, la coloración del cultivo es transparente. Lo que puede deberse a que no se presentó producción de clorofila en presencia del petróleo, esto debido a que como lo indican algunos autores como (Subramanian et al., 2016) algunas microalgas en presencia de carbono orgánico exhiben un régimen de alimentación diaúxico, es decir que se da un crecimiento heterotrófico en presencia de carbono orgánico y fotoautotrófico sólo en su ausencia. En contraste, tanto con el tratamiento de la microalga 69055 como con el de la microalga 69061, cuya evidencia fotográfica se encuentra en el anexo C2 y C3, tratamientos en los que se mantiene la coloración verde, en presencia de petróleo, similar a la del control positivo, indicando así producción de clorofila debido al crecimiento bajo condiciones fotoautotróficas.

1.2.2 Espectroscopia infrarroja

En los espectrogramas tomados a las muestras de los flóculos que se formaron entre la biomasa y petróleo, en el tamizaje de tolerancia, con petróleo al 1% en suspensión, se puede observar que en los tratamientos de cuatro de ellas, en el de

la 69057, 69059, 69060 y 69061, fueron inducidas transformaciones químicas sobre los grupos funcionales del petróleo, después de la exposición, figura 1, figura 2, figura 4, figura 5 y figura 6, mientras que la microalga con código 69055, a pesar de que es capaz de tolerar la presencia del estresor, puesto que en el medio de cultivo del tratamiento, se observa una tonalidad verde típica, similar al control positivo, indicativo de la producción de clorofila, no se detectó ninguna transformación a la estructura química del petróleo, figura 3.

A continuación, se presentan los espectrogramas obtenidos con espectroscopia infrarroja para cada una de las microalgas usadas en el tamizaje. En la figura 1, se encuentra el espectro FTIR-ATR correspondiente al tratamiento de la microalga 69059, se puede observar, al comparar el espectrograma obtenido del flóculo entre la biomasa y el crudo, con el espectrograma del petróleo, que en las dos réplicas se presenta una disminución en el área bajo la curva, sobre los picos con un número de onda correspondiente a 2916 y 2846 cm^{-1} . Esto puede deberse a que en la muestra de flóculo analizado había una cantidad menor del grupo funcional asociado a este número de onda, debido a que el área bajo la curva es una medida que se relaciona con la concentración de un grupo funcional dado. De manera paralela, hay picos en los que aumenta el área bajo la curva, como los picos en los números de onda, 2553 , 2152 y 2025 cm^{-1} , los picos en los números de onda 2253 cm^{-1} y 2152 cm^{-1} , están relacionados con la aparición de enlaces triples, tipo alquino, mientras que el pico en el número de onda 2025 cm^{-1} , con el grupo funcional de los alquenos, que es un hidrocarburo en el que un carbono se enlaza a otros átomos de carbono por medio de un enlace doble. En este espectrograma, el pico en el número de onda 2912 cm^{-1} que se evidencia en el espectro de biomasa, en el espectro del petróleo es muy pronunciado y en la muestra del floculo disminuye su altura.

En la figura 2, del tratamiento de exposición de la microalga 69061 se puede observar la presencia de un pico de absorbancia, sobre los intervalos de frecuencia de 3400 a 3300 nm , que está presente tanto en la muestra de biomasa como en

las muestras provenientes de los flóculos de las tres réplicas del tratamiento de exposición de esta microalga, este pico de absorción, no se encuentra en el espectro del petróleo y corresponde a la presencia del grupo funcional de las aminas alifáticas, que puede estar asociado a componentes de la membrana lipídica. Este hallazgo es un indicativo que en las muestras de los flóculos se toma biomasa y petróleo. También se puede observar que la absorbancia de las réplicas R2 y R3 es similar a lo largo del espectro, mientras que la absorbancia de la réplica R1 difiere significativamente en el tamaño del área bajo la curva, se presenta un pico con una absorbancia de 0,63 sobre el número de onda de 2916 cm^{-1} , el cual es considerablemente más alto, en comparación con la absorbancia en las otras dos réplicas en este número de onda, que oscila entre 0,30 y 0,32.

En el espectrograma de la microalga 69055, figura 3, no se evidencian cambios en el espectro de la muestra tomada al finalizar los treinta días de incubación con respecto al espectro del petróleo tomado del control negativo. A diferencia de los espectrogramas del tratamiento de la microalga 69061, figura 2, en los cuales hay aparición de nuevos picos, como el pico en el número de onda 1716 cm^{-1} , que representa el grupo de los ésteres COOH, indicativo de metabolismo biológico y el pico en el número de onda 1635 cm^{-1} , perteneciente a alquenos conjugados, indicativo de la transformación química que se está dando sobre los carbonos del petróleo inicial.

Los espectros de la biomasa de las microalgas, presentan varias similitudes entre ellos, los espectros de las microalgas 69057, 69059 y 69055, tienen picos de absorbancia altos, sobre los intervalos de frecuencia de 3400 y 3300 cm^{-1} y en el intervalo de 1640 y 1630 cm^{-1} . Se presenta una correspondencia entre el espectro de biomasa observado y el tipo de morfología celular, los espectros de la biomasa de 69060 y 69061, las cuales son microalgas ovaladas, de morfología cocoidal, con un diámetro entre 2 a $8\text{ }\mu\text{m}$ presentan similitudes que no presentan los espectros de las microalgas 69055, 69057 y 69059, las cuales son microalgas más grandes como se puede observar en las figuras del anexo B2, B3 y B4.

En la figura 4 el espectro FTIR correspondiente al tratamiento de la microalga 69057, se puede observar que ambos espectros, el del tratamiento y el del petróleo del control negativo, son similares en su forma, sin la aparición de nuevos grupos funcionales, aunque algunos picos del espectro del petróleo disminuyen su tamaño, como los picos en el número de onda 2920 y 2850 cm^{-1} , indicativos de la presencia del grupo orgánico de los alcanos, con lo que se puede inferir que la estructura del petróleo se modificó, paralelamente, otros picos se hacen más pronunciados, como el pico en el número de onda 2160 cm^{-1} , este pico está relacionado con la presencia del grupo funcional ceteno, dos átomos de carbono unidos por un enlace doble a un átomo de oxígeno. El pico en el número de onda 1978 cm^{-1} representa el enlace entre un átomo de carbono e hidrogeno, típico de los compuestos aromáticos lo que es un indicativo de la presencia de compuestos aromáticos. En la figura 5, en la que se encuentran los espectros de las réplicas en oscuridad del tratamiento de la microalga 69060, se puede observar que la réplica R3 tiene picos de absorbancia que se evidencian en el espectro de la biomasa, como lo son los picos en los números de onda 3263, 1627, 1539, 1118 y 1000 cm^{-1} , picos que no se evidencian en las otras dos réplicas, mientras que en la réplica R2 y R1 se evidencia la aparición de nuevos picos que son indicativos de la presencia de una sustancia con perfil biosurfactante, que no se evidencia en la R3, como lo son los picos entre las frecuencias de 1680 a 1720 cm^{-1} , adicionalmente los picos en los números de onda de 1454, 1373 y 1184 cm^{-1} , si se evidencian en la réplica R3. Esto puede deberse a que en la muestra analizada del flóculo de esta réplica había un contenido más alto de biomasa, y también al hecho que el biosurfactante se encuentra ligado en mayor proporción al petróleo residual del tratamiento, pues estos compuestos se intercalan en la interface aceite- agua, disminuyendo la tensión superficial y promoviendo cambios en el petróleo y disminuyendo la viscosidad del aceite y promoviendo su fluidización (Karlapudi et al., 2018). En cuanto al espectro de biomasa de la microalga 69060, se evidencian algunas similitudes con la presencia de los principales grupos funcionales que se encuentran en las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), extraídas de la microalga *Chlorella vulgaris* como

lo reportan (Zheng et al., 2019). El espectro FTIR de estos investigadores fue tomado desde los 1800 a los 800 cm^{-1} y en baja resolución, de 2 cm^{-1} , a pesar de esto se observan similitudes con el espectro FTIR reportado, entre los picos con los cuales hay correspondencia se encuentran, los de los números de onda de 1659 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} , 1259 cm^{-1} , 1137 cm^{-1} , 1049 cm^{-1} , 995 cm^{-1} , señales que también se ven reflejadas en los espectrogramas obtenidos de la biomasa de la microalga 69060, en los número de onda de 1639 cm^{-1} , 1546 cm^{-1} , 1443 cm^{-1} , 1246 cm^{-1} , 1141 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} y 999 cm^{-1} , respectivamente.

En la figura 6, en la que se encuentran los espectros de las réplicas en luz del tratamiento de la microalga 69060, se puede observar que la réplica R2 es diferente, pues el área bajo la curva es menor. En la R3 y R1 se evidencian picos que son indicativo de la presencia de una sustancia con perfil biosurfactante como los picos en 1708, 1462, 1377 y 1219 cm^{-1} . Cabe resaltar que la absorbancia de estos picos es más alta en las réplicas de oscuridad, por ejemplo en la réplica R1 del tratamiento en oscuridad, los picos en las frecuencias, de 1740 a 1720 cm^{-1} alcanzan una absorbancia cercana a 0,1 mientras que en la réplica R2, del tratamiento incubado en luz, el pico en estas frecuencias sola alcanza una absorbancia de 0,05.

En la figura 7, se muestra una comparación entre los espectros de la microalga 69060, expuesta al crudo durante 30 días, en condiciones de luz y oscuridad. Se resalta la presencia de nuevos picos que se hacen más pronunciados en la condición de oscuridad, como es el caso del pico en el número de onda de 1219 cm^{-1} , al igual que los picos en el número de onda 1724 y 1720 cm^{-1} , pertenecientes al grupo carbonilo, éster, que son indicativos de metabolismo biológico, demostrando así que se está presentando transformación de los compuestos, a partir de los hidrocarburos aromáticos policíclicos del petróleo. Otro pico que sobresale en el espectrograma de los tratamientos en oscuridad es el pico indicativo de la presencia de enlace de alcanos en el número de onda de 1450 cm^{-1} . Este fue uno de los hallazgos más significativos, pues al evidenciar que en los

tratamientos en oscuridad, los picos de absorción indicativos de la presencia de compuestos con perfil biosurfactante son más pronunciados, es acorde con lo expuesto por (Smith & Underwood, 2000), quienes sostienen que cuando las células de varias microalgas como *Cylindrotheca sp.*, *Navicula sp.* y *Nitzschia sp.*, se colocan en oscuridad, la producción de sustancias poliméricas extracelulares aumenta bajo estas condiciones, las reservas de glucano son utilizadas y las células continúan produciendo EPS por más de tres días.

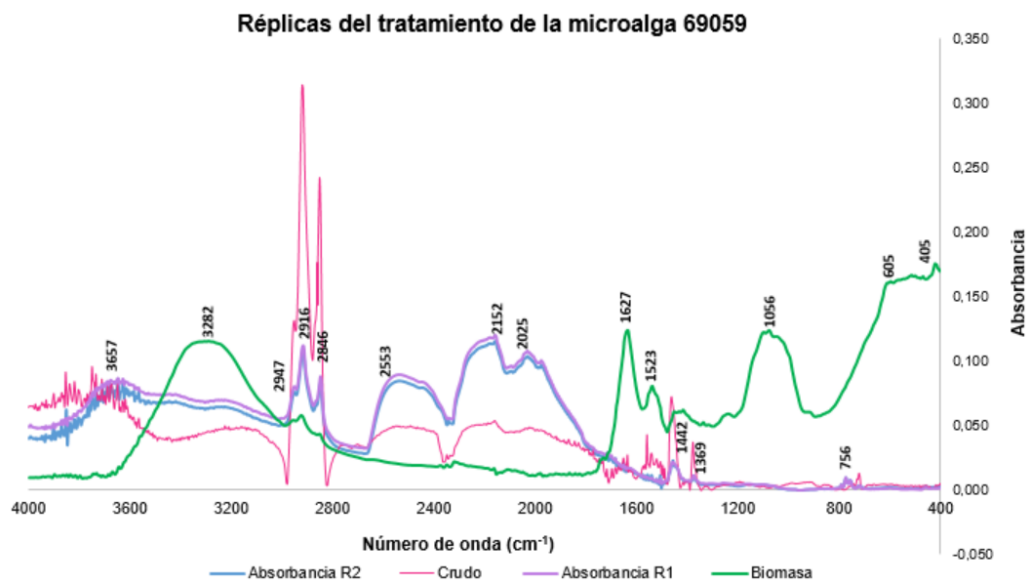


Figura 1. Espectros FTIR-ATR de las réplicas del tamizaje, provenientes de muestras de petróleo y biomasa seca, obtenidas después de 30 días de cultivo con la microalga 69059.

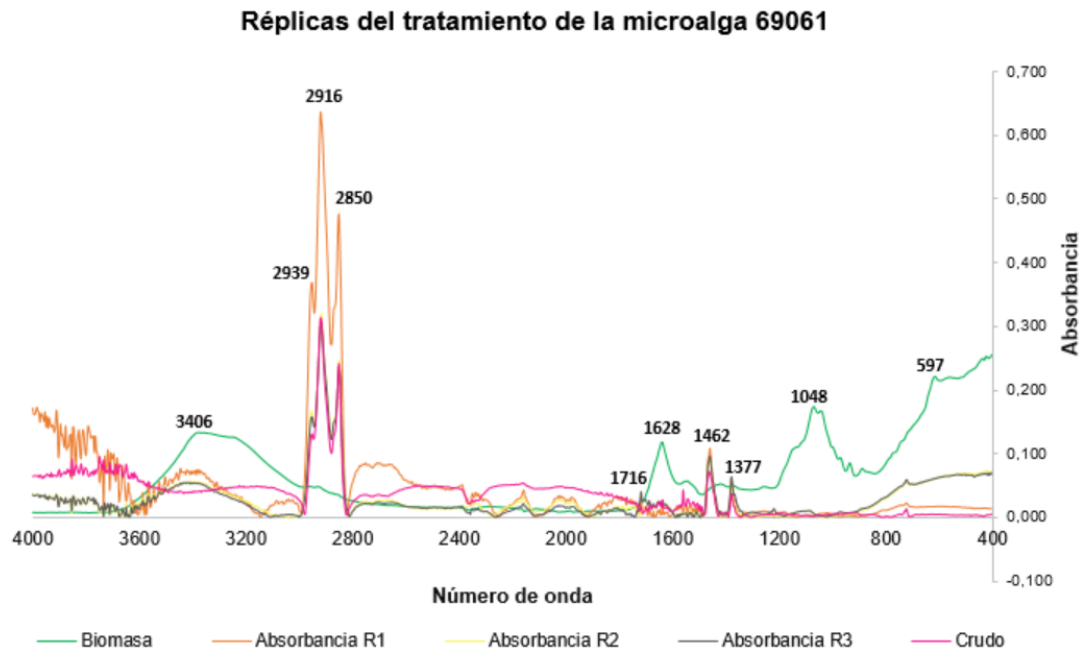


Figura 2. Espectros FTIR-ATR de las réplicas del tamizaje, provenientes de muestras de petróleo y biomasa seca obtenidas después de 30 días de cultivo con la microalga 69061.

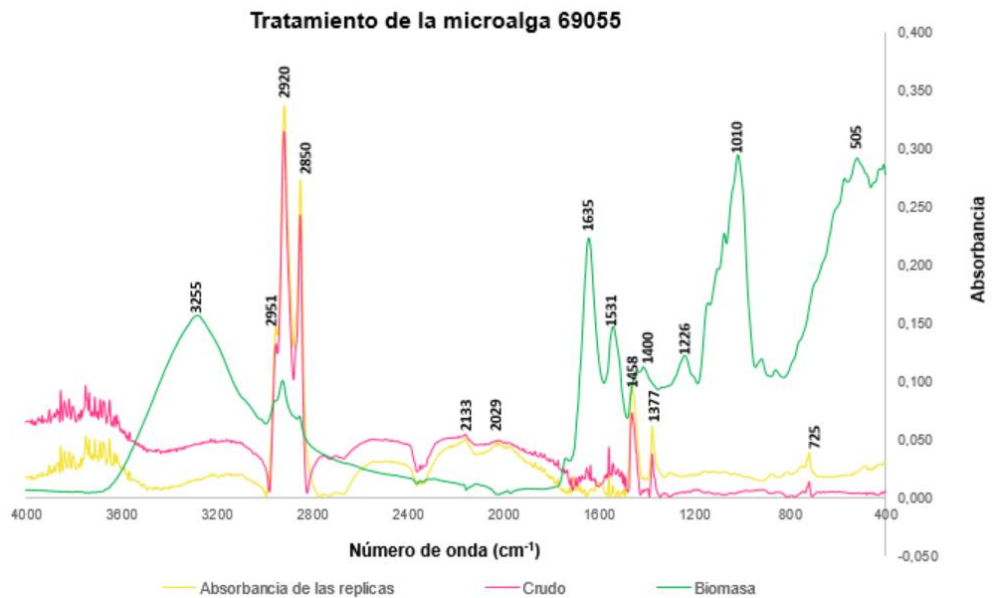


Figura 3. Espectro FTIR-ATR de la muestra compuesta, con las tres réplicas del tamizaje, obtenidas después de 30 días de cultivo con la microalga 69055.

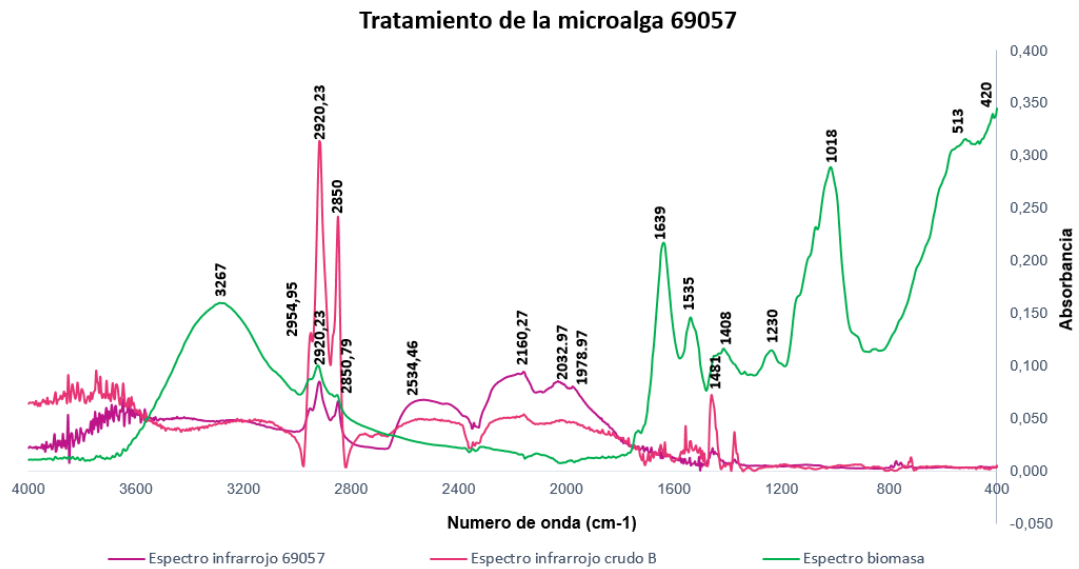


Figura 4. Espectro FTIR-ATR de una muestra de petróleo y biomasa seca, obtenida después de 30 días de cultivo con la microalga 69057 y petróleo al 1%.

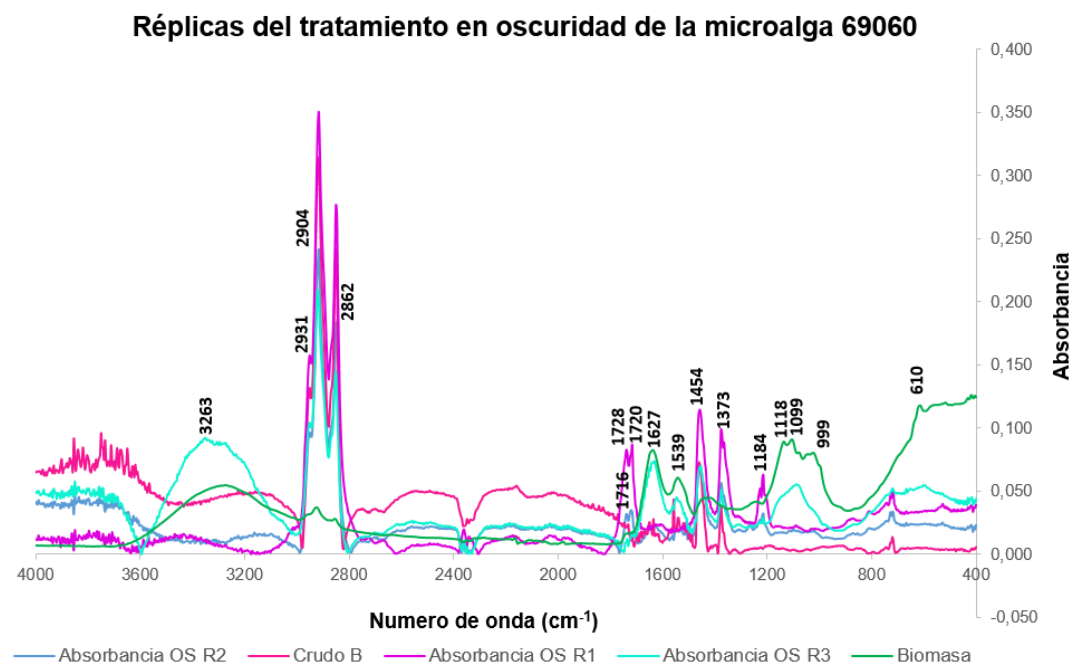


Figura 5. Espectros FTIR-ATR de las réplicas del tamizaje, provenientes de muestras de petróleo y biomasa seca, obtenidas de tres réplicas después de 30 días de cultivo con la microalga 69060, incubadas en oscuridad y petróleo al 1%.

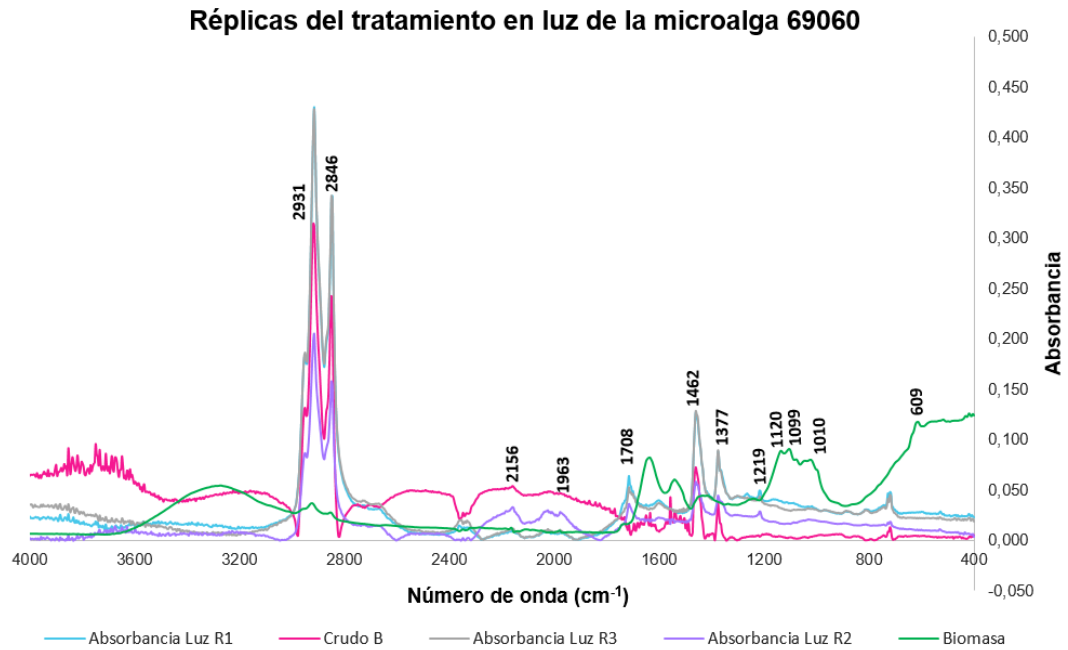


Figura 6. Espectros FTIR-ATR de las réplicas del tamizaje, provenientes de muestras de petróleo y biomasa seca, obtenidas de tres réplicas después de 30 días de cultivo con la microalga 69060 incubadas en luz y petróleo al 1%.

Espectros FTIR-ATR de la microalga 69060 en luz y oscuridad

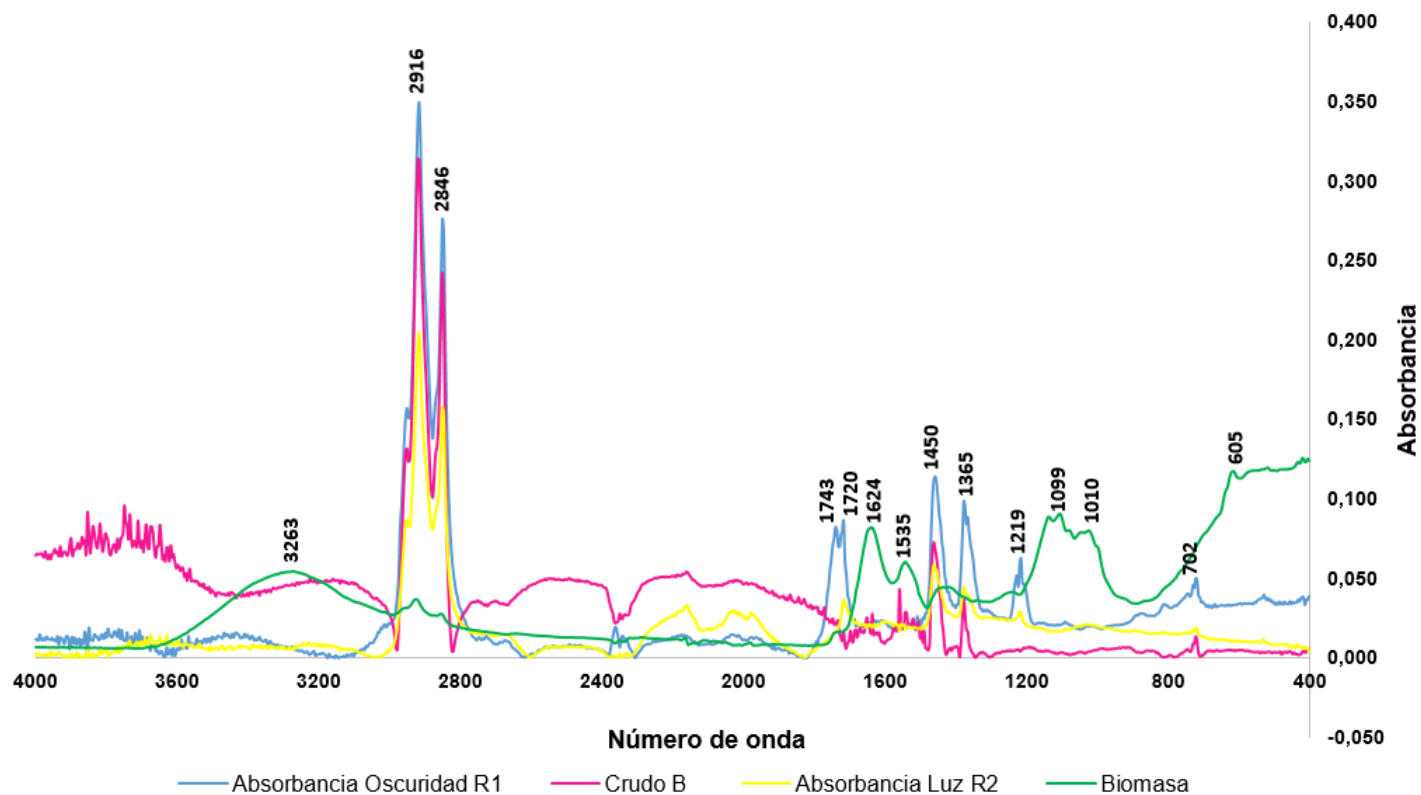


Figura 7. Comparación entre los espectros FTIR-ATR obtenidos de los flóculos secos del petróleo y la biomasa, después de 30 días de cultivo con la microalga 69060 expuesta a petróleo al 1 %, en diferentes condiciones de incubación.

Con respecto a los espectrogramas del tamizaje de tolerancia obtenidos a partir de las muestras de petróleo provenientes de los sobrenadantes de los tratamientos de las microalgas 69061 y 69057, (Fig. 2 y 4), en los que no se evidencia, como parte de los cambios inducidos a la estructura química del petróleo, la presencia de picos indicativos de compuestos de naturaleza biosurfactante, como en el tratamiento de la microalga 69060 en la figura 5 y 6, se puede inferir que, en estas microalgas, se está dando una actividad enzimática que les permite tolerar y metabolizar los hidrocarburos aromáticos policíclicos del petróleo, por lo que, cómo una perspectiva para el futuro, se pueden desarrollar ensayos encaminados a la detección de enzimas y caracterizar su actividad. En la figura del anexo C3 **B.**, se puede observar el crecimiento de la microalga 69061, en el tratamiento de exposición a petróleo al 1%, la coloración del tratamiento de exposición es muy similar a la coloración verde del control positivo C3.

En los resultados obtenidos del tratamiento de la microalga 69055 (Fig. 3), en el espectro FTIR del tratamiento de exposición a petróleo, no se evidencian cambios en la estructura del petróleo, a pesar de que se evidenció la formación de flóculos entre la biomasa y el petróleo, después de quince días de incubación, como se muestra en el Anexo C2, también se puede evidenciar la coloración verde típica del crecimiento microalgal, debido a la clorofila, durante este periodo de tiempo. Esto pudo deberse a la presencia de otros compuestos que promueven la disolución del petróleo sin transformar su estructura química o a otro tipo de procesos de incorporación celular que no cambian la estructura del contaminante. Esta observación se puede soportar en los procesos de acumulación de compuestos hidrofóbicos del petróleo, proceso por el cual el fitoplancton juega un rol crucial en el ciclo biogeoquímico de los contaminantes orgánicos persistentes, (POPs) que entran en los ambientes acuáticos (Shishlyannikov et al., 2017). Lo anterior encuentra su fundamento teórico, en la naturaleza hidrofóbica de los PAHs, que componen el crudo aceitoso, lo que permite que la microalga sea capaz de acumularlos en sus cuerpos lipídicos (Olivares et al., 2018) siendo así esta otra forma en la que las microalgas logran tolerar la presencia de estos contaminantes orgánicos. La longitud de las cadenas de hidrocarburos alcanos que se logran acumular dentro de la célula es

similar a las cadenas carbonadas alifáticas de los ácidos grasos de las microalgas, así, la inserción de los n-alcenos, dentro de la membrana bilipídica promueve el transporte de los hidrocarburos aromáticos poli cíclicos que componen el petróleo, dentro de la célula, por ejemplo, se ha logrado localizar la agregación del benzo(a)pireno en los cuerpos lipídicos de *Chlorella* sp., por medio de microscopia de fluorescencia confocal, lo que los autores describen como un proceso de transferencia de energía de resonancia de Förster entre el benzo(a)pireno y el fotosistema (Subashchandrabose et al., 2014). En cuanto al nivel de bioconcentración de estas sustancias al interior de la célula, depende de las propiedades físicas y químicas de los compuestos hidrofóbicos, de la hidrofobicidad de la superficie celular, así como del contenido lipídico cualitativo y cuantitativo.

1.2.3 Caracterización molecular y análisis filogenético

En la tabla 2 se encuentran los valores obtenidos en la cuantificación de ADN para el material extraído de cada estirpe y los valores de la relación 260/280 y 260/230. La cuantificación se realizó tanto para el ADN obtenido directamente de la muestra de ADN genómico, extraído de los cultivos sólidos de cada microalga, muestras que se relacionan en la tabla 2 con (S), como para muestras del ADN genómico extraído, que fueron diluidas en agua grado molecular identificadas con la letra (L).

Tabla 2. Cantidad de ADN obtenido de las muestras de las tres estirpes de microalgas marinas 69055, 69060 y 69061 y los valores de la relación 260/280 y 260/230.

Muestra	ADN (ng/ μ L)	260/280	260/230
Blanco	0	0	0
69055 (L)	7,7	126	63
69055 (S)	20,5	129	87
69060 (L)	49,8	177	198
69060 (S)	112,6	176	208
69061 (L)	7,7	154	158
69061 (S)	4,6	146	86

En la figura 8 se puede observar el gel que se obtuvo después de la electroforesis en agarosa al 2%, con el marcador de peso molecular, en el primer carril izquierdo; se logran identificar los amplicones con el tamaño esperado, correspondiente a cada par de cebador usado.

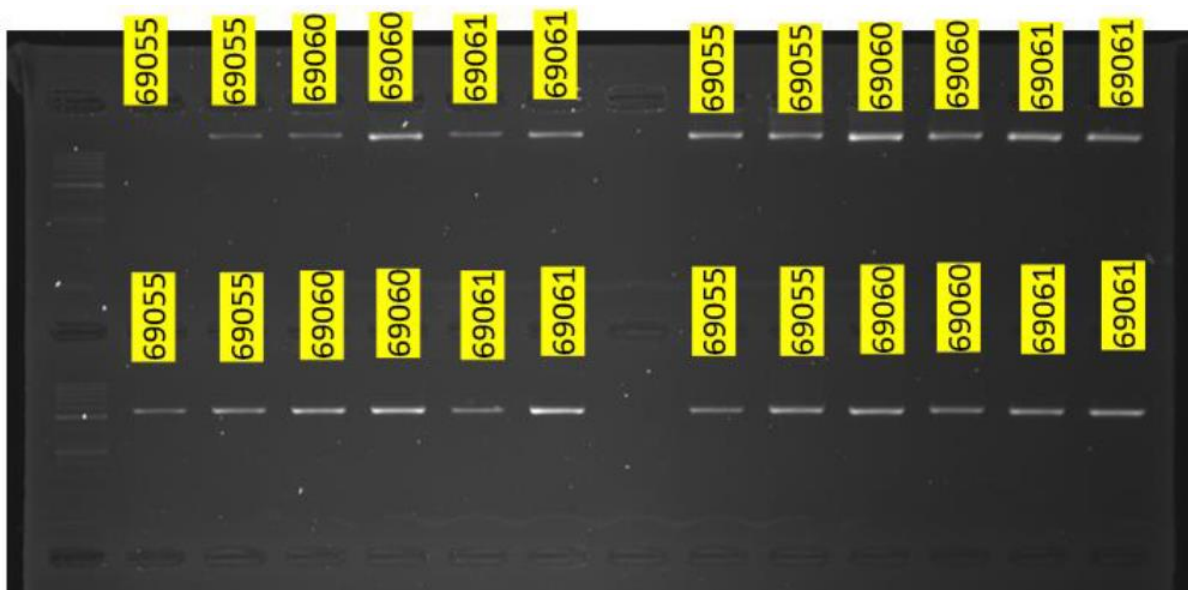


Figura 8. Gel de agarosa al 2% (p/v). En el panel superior se pueden observar los amplicones grandes > 1000 pb y en el panel inferior se observan los amplicones pequeños < 550 pb del gen ribosomal 18 S. En los paneles de la izquierda, se encuentran los amplicones obtenidos a partir de una dilución 1:10, en los paneles de la derecha se encuentran los amplicones obtenidos directamente del ADN genómico extraído.

Se obtuvieron un total de 12 secuencias, correspondientes a la dirección forward y reverse de los dos pares de cebadores empleados para cada microalga. Para las tres estirpes se logró ensamblar un fragmento de aproximadamente 1697 pb. Las secuencias corresponden a tres haplotipos con 125 sitios polimórficos, una diversidad nucleotídica P_i : 0,04951 y un número promedio de diferencias nucleotídicas, k : 83.33. En la tabla 3 se encuentran las 7 secuencias con las que se encontró un porcentaje de similitud mayor en el BLAST, para las tres estirpes. El material genético extraído de las tres microalgas mostró similitudes con una secuencia de *Nannochloris sp.*

(OQ096682.1) y en segundo lugar con *Nomia picochloropsia* (OK641940.1). Estas similitudes fueron corroboradas por el árbol filogenético de máxima verosimilitud, figura 9 y el árbol bayesiano, figura 10. Ambos árboles mostraron un alto soporte (ML: 98%; bayesiano: 1) de las estirpes 69060 y 69061 con *Nannochloris* sp. (OQ096682), al igual que una relación de clado hermano (ML: 96%; bayesiano: 1), de la estirpe 69055 con el grupo conformado por 69061 y 69060, *Nannochloris* sp. (OQ096682) y por *Nomia picochloropsia* (OK641940.1).

Tabla 3. Secuencias del NCBI con las que los cultivos de las microalgas 69055, 69060 y 69061 tuvieron alineamientos significativos.

Estirpe	Secuencias con homologías	% identidad	Nombre científico
69061	OQ096682.1	97.151	<i>Nannochloris</i> sp. strain RIL 101218
	OK641940.1	96.914	<i>Nomia picochloropsia</i> strain TAU-MAC 3617
	AY195968.1	95.650	<i>Nannochloris</i> sp. AS 2 - 10
	KM020184.1	95.592	<i>Stichococcus</i> sp. SAG 52.87
	LN610705.1	95.024	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> var. <i>acidicola</i>
	KM020039.1	95.024	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> strain SAG
	AJ439399.2	95.024	<i>Chlorella protothecoides</i> var. <i>acidicola</i>
69060	OQ096682.1	99.881	<i>Nannochloris</i> sp. strain RIL 101218
	OK641940.1	99.526	<i>Nomia picochloropsia</i> strain TAU-MAC 3617
	AY195968.1	96.568	<i>Nannochloris</i> sp. AS 2-10
	KM020184.1	96.511	<i>Stichococcus</i> sp. SAG 52.87
	LN610705.1	96.388	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> var. <i>acidicola</i>
	KM020039.1	96.388	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> strain SAG
	KF791551.1	96.386	<i>Nannochloris</i> sp. JB17
69055	OQ096682.1	96.214	<i>Nannochloris</i> sp. strain RIL 101218
	OK641940.1	96.214	<i>Nomia picochloropsia</i> strain TAU-MAC 3617
	AY195968.1	95.949	<i>Nannochloris</i> sp. AS 2-10

69055	KM020184.1	95.831	<i>Stichococcus sp.</i> SAG 52.87
	AB058349.1	95.106	<i>Chlamydomonas sp.</i> MBIC 10468
	Y14950.1	95.65	<i>Chlorella sp.</i>
	LN610705.1	95.592	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> <i>var. acidicola</i>

Con respecto a la secuencia de *Nannochloris sp.* (OQ096682), reportada por (Paul et al., 2022), con la que se encontró afinidad dentro de la construcción filogenética realizada, por las secuencias ensambladas de las estirpes 69060 y 69061, es importante resaltar varios aspectos, entre estos, primero, 69060 forma un clado monofilético con esta microalga y muy cerca diverge la estirpe 69061. La secuencia de esta microalga fue reportada en India, en el 2022, la microalga marina fue aislada a partir de muestras de agua de mar e identificada por evaluación fotosintética multiparámetrica, como por secuenciación del gen ribosomal de la subunidad pequeña 18s, usando solo un par de cebadores. Los investigadores realizaron análisis fotobiológicos sobre la eficiencia fotosintética usando métodos cinéticos no invasivos. Esta microalga exhibió la capacidad de crecer en un sistema de cultivo a gran escala de 50.000 litros, soportando altas temperaturas y variaciones estacionales del cultivo, debido a la presencia de una antena funcional pequeña, al igual que a una cinética rápida no-fotoquímica, ligada a la disminución de la intensidad lumínica y a una tasa fotosintética alta. Es importante resaltar que se identificaron algunas limitaciones con respecto a la construcción de la filogenia reportada por estos investigadores. Entre estas, fueron usadas solo especies con morfología relacionada, entre las que se encontraban géneros como *Nannochloropsis*, *Picochlorum*, *Chlorella* y *Nannochloris*, empleando un total de 13 secuencias únicamente. Y fue empleada una secuencia de *Chlorella vulgaris* AY948419 como el grupo externo, lo que debió sesgar en gran medida la organización de la filogenia. Con respecto a esto, como lo indican (Temraleeva et al., 2022), el uso de varios taxones relacionados en un análisis filogenético permite establecer la divergencia a nivel de especie, en la filogenia reportada por estos

autores fueron usadas aproximadamente 92 secuencias para la construcción filogenética y de las cuales, diez secuencias eran el grupo externo del análisis filogenético, de manera paralela, en la construcción de (Lortou et al., 2022) fueron empleadas aproximadamente 130 secuencias de las cuales 25 representaban el grupo externo de la construcción. Fueron seleccionadas para la construcción secuencias relativamente cercanas, de familias representativas de los ordenes Sphaeropleales, Chlorellales, Chlamydomonadales y Chaetophorales, pertenecientes a la clase Chlorophyceae y Trebouxiophyceae. Cabe resaltar igualmente que en la construcción de estos autores fueron usados otros dos marcadores el *rbcL* y la región ITS adicionales al de la subunidad pequeña del gen ribosomal 18S.

Ahora haciendo referencia a la secuencia de *Nomia picochloropsia* (OK641940.1), con la cual se evidencio una relación de clado hermano tanto con la secuencia de la estirpe 69055, y de manera más cercana, con 69060 y 69061. Es una nueva especie tipo, reportada en agosto del 2022, aislada del área del Mediterráneo, la cual es una ecoregión con una alta diversidad. En este trabajo los investigadores, a partir de diez y ocho aislamientos y empleando un enfoque polifásico, que incluyo características morfológicas y ultraestructurales, filogenia basada en el gen 18S, la región ITS entre el 18S y 28S y el gen *rbcL*, soportaron el establecimiento de cuatro géneros nuevos *Nomia*, *Ava*, *Akraea* y *Lilaea* y de cinco especies nuevas *Spongiosarcinopsis limneus*, *N. picochloropsia*, *Av. limnothalassea*, *Ak. chliaropsychia* y *L. pamvotia*.

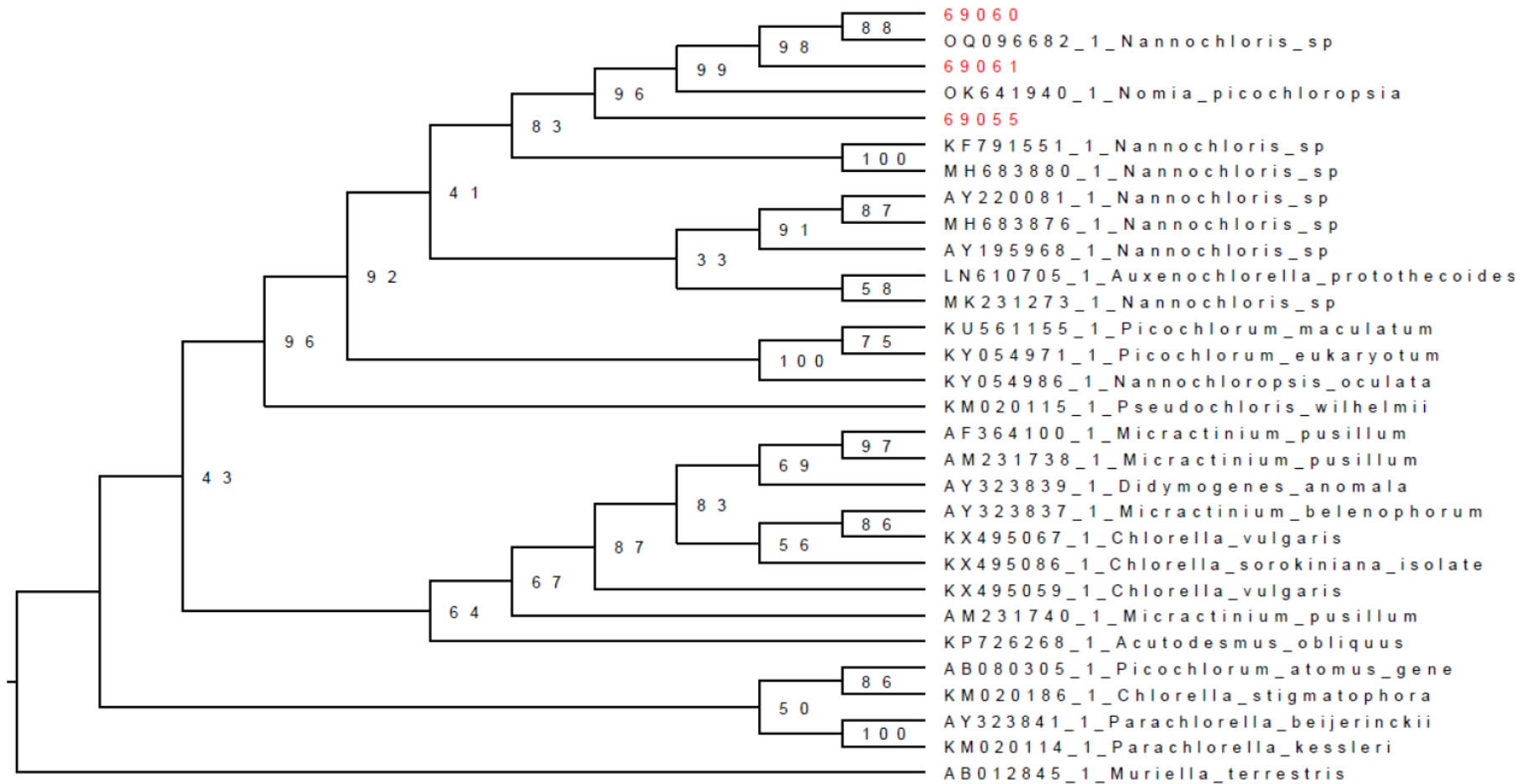


Figura 9. Árbol de máxima verosimilitud donde se muestra la relación de los cultivos 69061, 69060 y 69055 con *Nannochloris* sp. (OQ096682.1) y *Nomia picochloropsia* (OK641940.1)

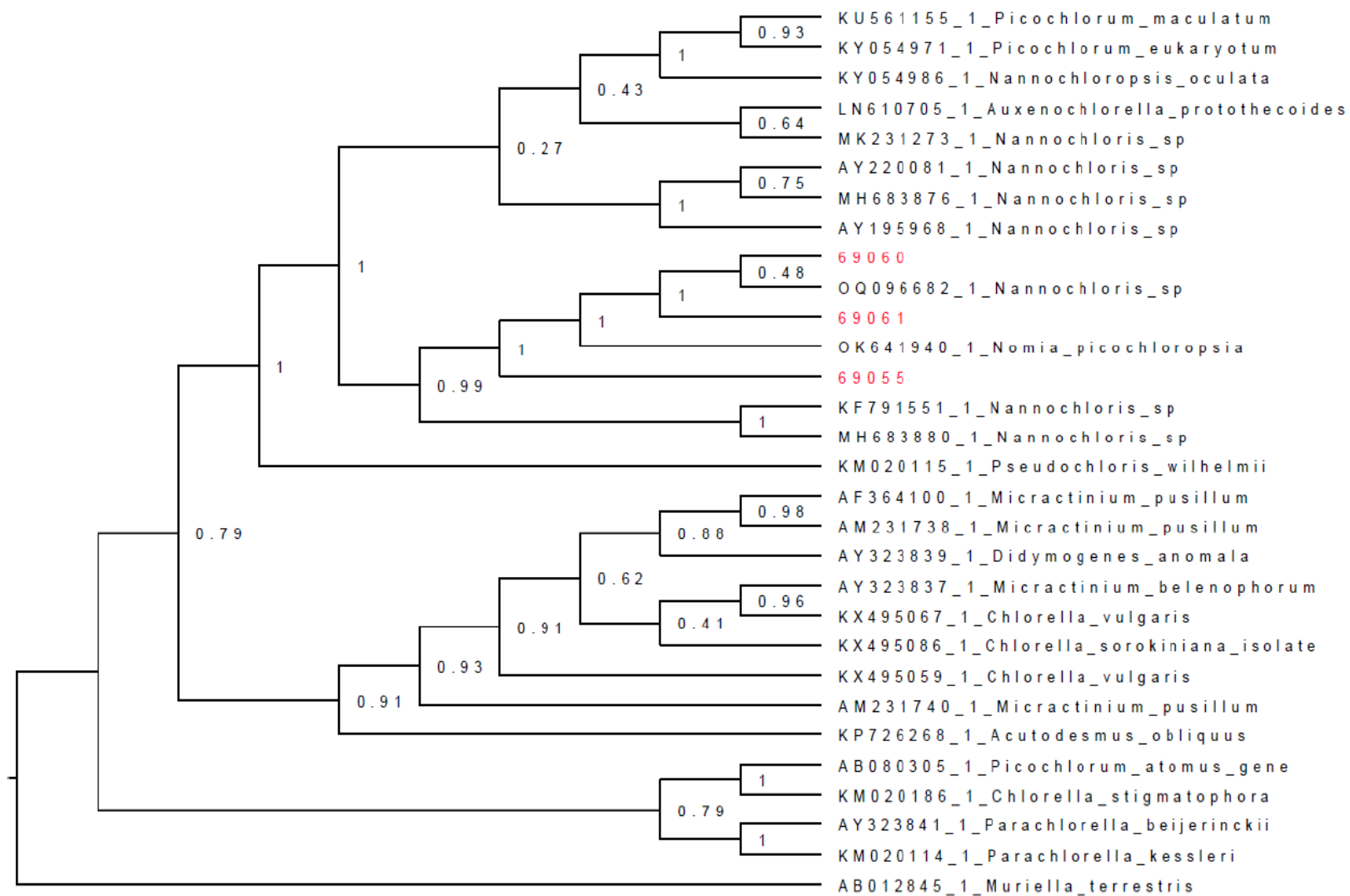


Figura 10. Árbol bayesiano donde se evidencia la relación de las estirpes 69060, 69061 y 69055 con *Nannochloris* sp. (OQ096682.1) y *Nomia picochloropsia* (OK641940.1)

En esta construcción filogenética realizada con el fin de identificar molecularmente las tres microalgas empleadas en el tamizaje, en las que se observó la capacidad de crecer en presencia del estresor, es importante resaltar varios aspectos. Primero, las microalgas verdes cocoidales tipo *Nannochloris* han cambiado por evolución convergente, que es muchas veces inidentificable por microscopia, incluyendo microscopia de transmisión electrónica (TEM). Esta morfología relativamente simple encubre una gran diversidad ecológica, fisiológica y filogenética (Temraleeva et al., 2022). Esta alta variabilidad genética se hizo evidente al encontrar que las tres microalgas que se secuenciaron, son haplotipos que presentan ciento treinta y siete polimorfismos entre ellas. Segundo, estudios recientes basados en secuencias nuevas, obtenidas a partir de la secuenciación del 18S rRNA, han mostrado que *Nannochloris* es un género polifilético. El uso de herramientas moleculares y de marcadores como la actina para vislumbrar relaciones filogenéticas, ha revolucionado la investigación en diversidad algal, incluyendo el descubrimiento de nuevas especies. Las características morfológicas y ultraestructurales, una comparación entre los tipos de reproducción y hábitats, al igual que las diferencias en el gen 18S rRNA y la estructura secundaria ITS2 de las especies estudiadas, ha permitido renombrar y proponer nuevos géneros como *Edaphochloris* (Temraleeva et al., 2022), *Picochlorum* (Henley et al., 2004), *Pseudochloris* (Somogyi et al., 2013) y *Pumiliosphaera* (Dariencko & Pröschold, 2015), lo que indica que es necesario ahondar en la clasificación de las algas verdes cocoidales. Este inconveniente, con el estudio de la diversidad de las algas cocoidales verdes, viene de décadas atrás y aún continúa, porque su morfología uniforme y simple hace la identificación muy difícil. (Temraleeva et al., 2022), indican que la nueva especie tipo *Edaphochloris andrejevii* difiere del género relacionado *Nannochloris* por la forma de la célula y el tamaño, el tipo de cloroplastos, el tipo de reproducción, hábitat y el valor de las distancias genéticas. Por lo que se ha aceptado que la mejor aproximación para crear una clasificación nueva, más natural de las microalgas verdes circulares es combinar métodos morfológicos, ecofisiológicos y filogenéticos. Tercero, desde que se empezaron a usar las secuencias del 18S rARN, para realizar construcciones filogenéticas en el

género *Nannochloris*, se han podido distinguir los géneros y especies del clado *Nannochloris*. Actualmente, el género *Nannochloris*, después de varias reorganizaciones, incluye solo una especie *N. bacillaris* y el clado *Nannochloris* incluye miembros de seis géneros que se dividen en dos grupos según su habitat, el de agua dulce y marina, el grupo de agua marina incluye a *N. atomus*, *N. eucaryotum*, *N. oculata*, *N. maculata* y otras especies tipo *Nannochloris* como *Picochlorum* y *Pseudochloris*, mientras que en el grupo de agua dulce se incluye a *Nannochloris coccooides* agrupada con especies del género *Marvania* (Temraleeva *et al.*, 2022).

Las cepas de *Chorella sp.*, con las que se encontró un porcentaje de similitud alto, usando el algoritmo de BLASTn, se agrupan en diferentes clados dentro del árbol de la construcción filogenética Figura 9 y Figura 10, una de las secuencias que fue usada, pertenecientes a este género, identificadas como 1. *Chorella stigmatophora* con código accesoión KM020186, se relaciona con *Picochlorum atomus* mientras que 2. *Chlorella vulgaris*, con código de accesoión KX495059 y 3. *Chlorella sorokiniana* KX495086, exhiben una relación de clados hermanos. Y la secuencia 4. *Chlorella vulgaris* con código de accesoión KX495067 aparece formando un clado monofilético con *Micractinium belenophorum*. Esto se debe a que bajo la morfología simple cocal de *Chlorella sp.*, se esconde una historia evolutiva amplia, muchas otras microalgas verdes de morfología circular se desarrollaron como linajes filogenéticos independientes como resultado de la evolución convergente dentro de la clase Chlorophyceae y Trebouxiophyceae. Por esta razón, más de 100 taxás han sido mal designados como *Chlorella sp.*, estudios de quimiotaxonomía y con marcadores moleculares lo han demostrado. Las algas verdes con fenotipos diferentes se han identificado como relativamente cercanas por técnicas moleculares (Krienitz *et al.*, 2015).

1.2.5 Obtención de extracto liofilizado rico en biosurfactantes

La figura 9 muestra el espectro FTIR-ATR del extracto liofilizado rico en moléculas anfipáticas, con perfil biosurfactante, extraído a partir de los bioensayos del tamizaje realizados en seis unidades experimentales, de 20 mL. Se evidencia la presencia de picos de absorbancia que son indicativos de la presencia de los principales grupos funcionales de estos compuestos. Se pueden observar dos picos prominentes entre 2800 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones por centímetro, del enlace CH; los picos en el número de onda de 1716 cm^{-1} indican vibraciones estrechas de ésteres (-COOH) y los cuatro picos entre el número de onda de 1300 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} , se deben a vibraciones estrechas de anillos superpuestos con vibraciones de grupos C-OH y C-O-C, evidenciando la presencia de estas moléculas. El perfil obtenido en este extracto liofilizado posee varias similitudes con los espectros FT-IR de los extractos biosurfactantes de *Halomonas sp.* INV PRT124 y el de *Bacillus sp.* INV FIR48 reportados por (Patiño et al., 2021), al igual que con el espectrograma FT-IR del biosurfactante de *Bacillus subtilis* caracterizado por (Castillo et al., 2021). Con fines comparativos se reporta que se lograron obtener 0,0018 g de extracto orgánico, a partir de un volumen total de 120 mL de medio F/2, alcanzando un porcentaje de producción de extracto rico en biosurfactantes del 1,5%.

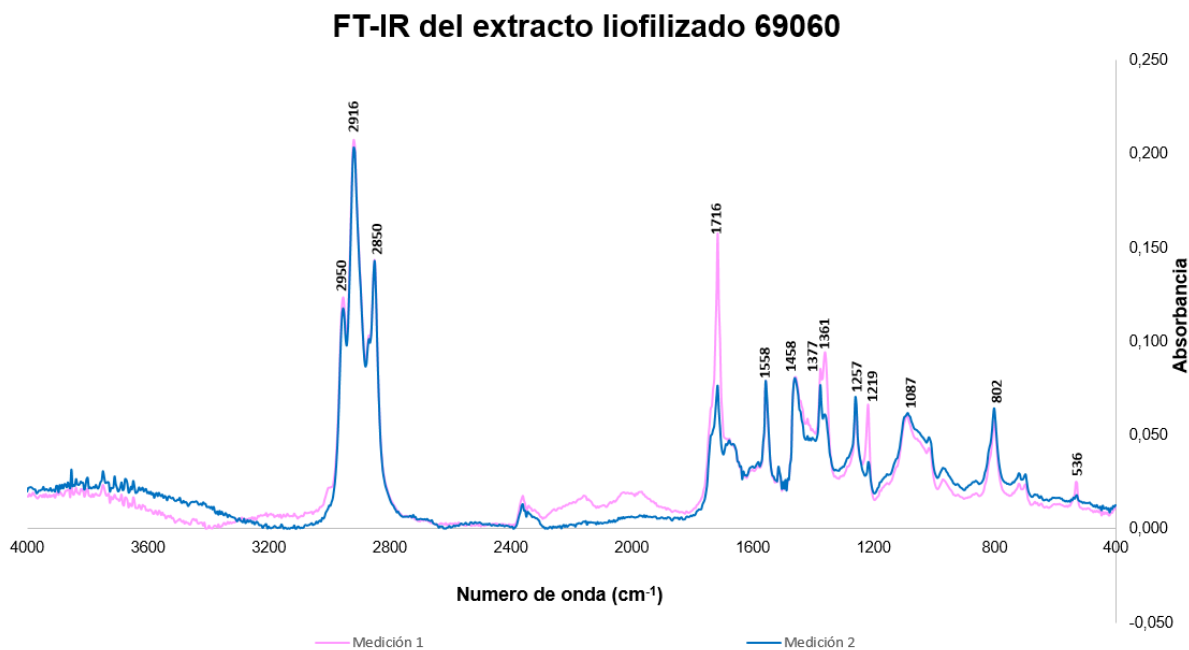


Figura 9. Espectros FTIR-ATR de dos mediciones del extracto liofilizado obtenido a partir de los bioensayos del tamizaje de 20 mL con la microalga 69060, en una muestra compuesta de seis sobrenadantes.

1.2.6 Aumento de la producción de biosurfactantes en tratamientos de oscuridad

En la figura 10, se muestra el espectro FTIR del extracto obtenido a partir de un volumen de trabajo mayor, a partir de la muestra compuesta de sobrenadantes provenientes de seis Erlenmeyers de 200 mL, es decir a partir de un volumen total de 1.2 L de medio de cultivo, que fueron incubados en oscuridad. Con relación al espectrograma de la figura 9, obtenido del extracto liofilizado, recuperado a partir de los tratamientos de menor volumen, desde 120 mL de medio de cultivo, se puede ver la aparición de nuevos picos como es el caso del pico en el número de onda de 3352.28 cm⁻¹, indicativo de la presencia de aminas secundarias, posiblemente debido a la síntesis de aminoácidos aromáticos, que se pueden atribuir a residuos peptídicos como lo indica (Castillo et al., 2021), en el espectro de estos investigadores, el pico en este intervalo de frecuencia se encuentra en el número de onda 3320 cm⁻¹. En la figura 5, en la que se encuentran las réplicas del tamizaje,

del tratamiento en oscuridad, de la microalga 69060, también se puede observar este pico en la R3, en el intervalo de frecuencia de 3350 a 3260 cm^{-1} , igualmente es un pico que está presente en la espectro FT-IR de la biomasa, aunque presenta una absorbancia menor. A partir de estos tratamientos, con un volumen de trabajo mayor, procedentes de 1200 mL incubados en oscuridad, se extrajeron 0,012 g de extracto, aproximadamente 0,010 g/L, con un porcentaje de producción de 1%. Con esta relación, se observa que el porcentaje de producción de extracto liofilizado rico en biosurfactantes, fue mayor en los tratamientos de menor volumen, lo que se pudo deber a la variabilidad menor, que se presenta en las condiciones de cultivo de los tratamientos de menor tamaño.

En general, estas EPS tienen interés para muchas aplicaciones industriales como emulsificantes, espesantes, biosurfactantes, bioaditivos y/o agentes reductores de dragado. Adicionalmente, exhiben potencial en el campo médico por su efecto biológico como antivirales, anti-inflamatorios, anti-coagulantes, anti-oxidantes, anti-alérgicos, anti-fúngicos, antitusivo o inmunomoduladores (Halaj et al., 2019). En la figuras 9 y 10, se muestran los espectros FTIR del biosurfactante, que se logró extraer de los bioensayos de tolerancia con la microalga 69060, a partir de diferentes volúmenes de medio de cultivo, provenientes de las muestras compuestas, que contenían los sobrenadantes libres de células, los espectros obtenidos presentan grandes similitudes con el espectro FTIR de *Bacillus subtilis* reportado por (Castillo et al., 2021), en el que observa la presencia de hidrocarburos alifáticos y compuestos nitrogenados. (Sitachitta et al., 2000) indican que en los espectros IR de dos lipopéptidos reportados hay unas bandas fuertes de absorción en 1732 y 1661 cm^{-1} , que indican la presencia de los grupos funcionales éster y amida, estas bandas las podemos observar en los espectrogramas de las figuras 9 y 10. En el espectro FTIR-ATR reportado por (Fernandes et al., 2020) del extracto lipofílico recuperado a partir de *Pavlova pinguis* se puede observar la presencia de varias bandas semejante al espectrograma de la figura 10, como lo son las bandas en el número de onda 2956, 2219, 2851, 1733

y 721 cm^{-1} , bandas que encontraron los números de onda de 2954, 2920, 2850, 1724 y 729 cm^{-1} , respectivamente. La diferencia más notoria entre los espectrogramas de las figuras 9 y 10, es la presencia, en la figura 10, del pico en el número de onda 3352.28 cm^{-1} , que corresponde a la presencia del grupo funcional de las aminas alifáticas.

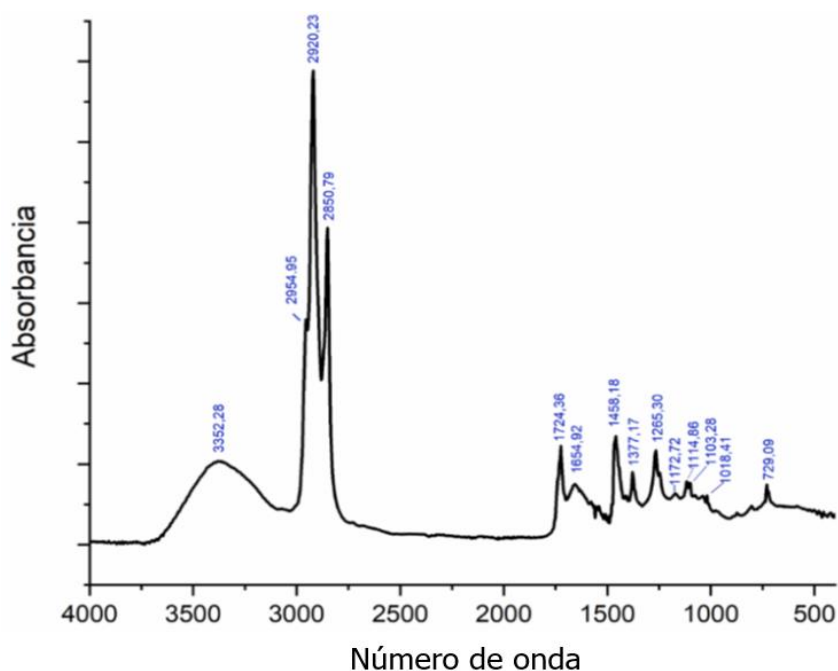


Figura 10. Espectro FTIR-ATR del extracto liofilizado extraído a partir de una muestra compuesta con sobrenadantes provenientes de un volumen de 1200 mL, de cultivos incubados en oscuridad de la microalga 69060.

1.2.7 Análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) a través de desreplicación en la base de datos GNPS.

En la figura 11, se muestra, el cromatograma de iones totales, obtenido del extracto, analizado por cromatografía líquida ligada a espectrometría de masas LC-MS/MS. Esta técnica permite identificar los pesos moleculares de las moléculas presentes en el extracto. El cromatograma presenta numerosos picos, lo que sugiere que hay varios compuestos en el extracto, cada pico representa una

molécula que ionizó de una manera óptima en el extracto. Se observan dos zonas de alta densidad, lo que indica que estos compuestos tienen una mayor intensidad, es decir están presentes, dentro de la mezcla del extracto, en una proporción mayor, por lo que exhiben una abundancia relativa mayor. Estas zonas son alrededor del minuto 8 y 12, que son los tiempos en los cuales la señal aumenta haciéndose más intensa, con una masa de fragmento de 281.29, también hay una zona de alta densidad de 18 a 22 min, con una masa de fragmento de 393.29. La señal en el tiempo de retención de 12 min que presenta un peso molecular de 281, 29, está relacionada con el fragmento ionizado reportado para la plipastatina en la base de datos de GNPS.

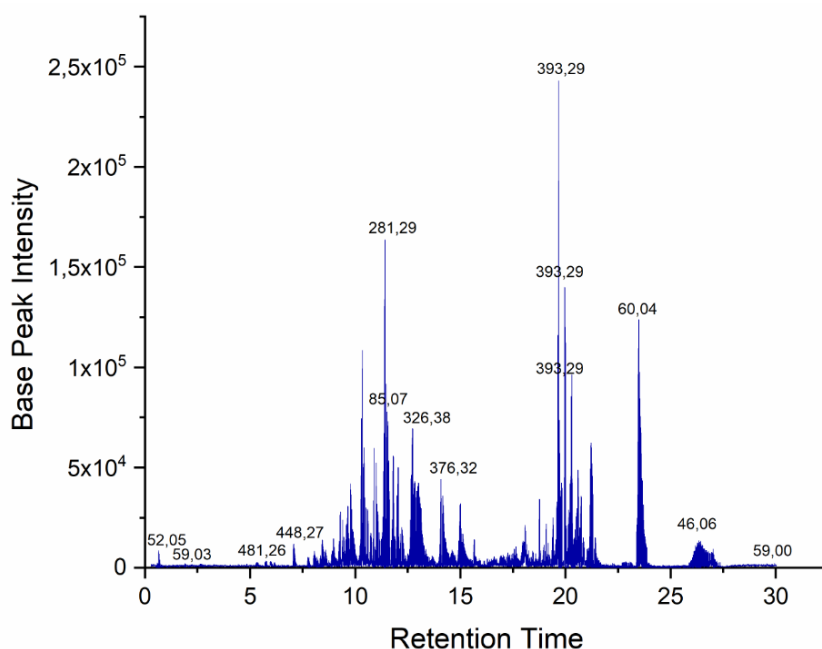


Figura 11. Cromatograma de iones totales obtenido con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), proveniente del extracto rico en biosurfactantes obtenido a partir de 1200 mL de los bioensayos de la microalga 69060

Luego por técnicas de desreplicación se identificaron que masas moleculares reportadas en el cromatograma de iones totales, se podían relacionar con compuestos reportados en la base de datos. Se pueden encontrar los resultados de la desreplicación realizada en el siguiente link

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=7d5a709abe1b47bb9ce302be5e9c145c>.

Al analizar los resultados obtenidos en la base de datos de espectrometría de masas, para productos naturales, de la Universidad de California San Diego, la USCD, con la información suministrada en el cromatograma se obtuvo una concordancia con la plipastatina. La cuál es un lipopéptido no ribosomal, con actividad antimicrobiana, principalmente antifúngica, además tiene un valor agregado para el desarrollo de drogas y reactivos terapéuticos. Se sabe que este lipopéptido es sintetizado por algunas bacterias como *Bacillus subtilis* (Tsuge et al., 2007), pero no se encontraron reportes de este en microalgas.

La producción de los lipopéptidos, se ha reportado en bacterias, cianobacterias y otros microorganismos, como las microalgas (Bussa et al., 2019) estos compuestos, tienen múltiples roles industriales como biosurfactantes y antimicrobianos, por ejemplo; se tiene conocimiento que los microorganismos productores de lipopéptidos son buenos agentes biocontroladores (Malviya et al., 2020).

Dadas las condiciones extremas de los ambientes marinos, como por ejemplo la alta salinidad, se espera que, los biosurfactantes extraídos de estos ecosistemas presenten una diversidad estructural y funcional mayor, a la de sus semejantes extraídos de entornos terrestres, con respecto a esto (Talero et al., 2015b) han encontrado que las microalgas producen nuevas estructuras moleculares debido a la rica composición en átomos halógenos del agua de mar. Según (Fernandes et al., 2020) los organismos marinos exhiben una variabilidad química intrínseca que los hace ser fuente de moléculas con un amplio rango de aplicaciones y (Hossain et al., 2005) indican que varios lípidos complejos son inusuales en plantas terrestres y animales pero están presentes en grandes cantidades en algunas especies de algas marinas.

Conclusiones

- La oxidación de los hidrocarburos en un medio salino, desarrollada por organismos halófilos y halotolerantes es única y útil como tratamiento biológico de los ecosistemas marinos y estuarinos, contaminados con derivados de petróleo (Paniagua et al., 2014).
- La aplicación de los resultados anteriormente obtenidos, es promisorio para el uso de microalgas y/o sus compuestos en la biorremediación *in situ* de ambientes frágiles y sensibles. Paralelamente, la remoción de la sal en el agua de mar, para actividades de agricultura puede ser exitosa con el uso de las sustancias poliméricas extracelulares, producidas por los organismos marinos como las microalgas.
- Los resultados obtenidos cobran una relevancia alta en el contexto mundial actual, ya que, según (Paniagua et al., 2014), existe una preocupación emergente a nivel global por obtener, agentes de superficie activa, no tóxicos ni peligrosos, como los biosurfactantes, que contrario a los surfactantes sintéticos, exhiben como función primaria, facilitar la presencia microbiana en ambientes dominados por interfaces hidrofílicas/hidrofóbicas.
- Actualmente existe un interés particular sobre nuevas fuentes y aplicaciones de los organismos marinos y de profundidad, por el uso promisorio de sus exopolisacáridos como biosurfactantes, emulsificadores u otros roles poliméricos
- En la numerosa y ampliamente diversa división Chlorophyta, nuevos taxones se descubren cada año y sus relaciones se reconstruyen con la incorporación de métodos filogenéticos dentro de la taxonomía tradicional.

Recomendaciones y perspectivas futuras

- La actividad biológica de muchos lipopéptidos no ha sido estudiada, como lo indica (Dembitsky, 2022), por lo que se recomienda emplear el software PASS para estudiar la actividad biológica de los ácidos grasos presentes en los extractos como de los aminoácidos, el programa logra confirmar los datos experimentales sobre la actividad biológica de los compuestos de interés. Con respecto a esto, según (Fernandes et al., 2020), de las clases de productos naturales, la composición de los alcoholes alifáticos (LC-alcoholes) de cadena larga, los glucósidos de éster y los mono glicéridos en las microalgas están poco estudiados.
- La ventaja de usar microalgas cultivadas para la producción de biosurfactantes es que muchos de estos microorganismos se encuentran en la categoría (GRAS) – generally recognized as safe – por sus siglas en inglés. Este certificado indica que los organismos no tienen toxicidad, patogenicidad o riesgo en la industria farmacéutica o de alimentos.
- Realizar mediciones de la tensión superficial del medio de cultivo proveniente de tratamientos de exposición a crudo, con la microalga 69060, que permitan tener un dato cualitativo de la capacidad que exhiba un extracto libre de células para solubilizar compuestos orgánicos hidrofóbicos.

Bibliografía

- Almaliti, J., Malloy, K. L., Glukhov, E., Spadafora, C., Gutiérrez, M., & Gerwick, W. H. (2017). Dudawalamides A-D, Antiparasitic Cyclic Depsipeptides from the Marine Cyanobacterium *Moorea producens*. *Journal of Natural Products*, 80(6), 1827–1836. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00034>
- Ayala, & Dussán. (2018). *Bioprospection for petroleum hydrocarbon bioremediating microorganisms in hypersaline environments and barium-resistant microbiota in oil exploitation wastewater*. Universidad de los Andes.
- Bauer, A., & Minceva, M. (2019). Direct extraction of astaxanthin from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* using liquid-liquid chromatography. *RSC Advances*, 9(40), 22779–22789. <https://doi.org/10.1039/c9ra03263k>
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., & Kovar, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: Achievements, potential and possible limitations. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 91, Issue 1, pp. 31–46). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3311-6>
- Bussa, M., Eisen, A., Zollfrank, C., & Röder, H. (2019). Life cycle assessment of microalgae products: State of the art and their potential for the production of polylactid acid. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 213, pp. 1299–1312). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.048>
- Carrera, D., Mateos, A., López, V., & Costas, E. (2010). Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.016>
- Castillo, Mugica V., Roldán T., Olguin P., & Castorena G. (2021). Modification of wettability and reduction of interfacial tension mechanisms involved in the release and enhanced biodegradation of heavy oil by a biosurfactant. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 20(3). <https://doi.org/10.24275/RMIQ/IA2427>
- Chang, W., Li, Y., Qu, Y., Liu, Y., Zhang, G., Zhao, Y., & Liu, S. (2022). Mixotrophic cultivation of microalgae to enhance the biomass and lipid production with synergistic effect of red light and phytohormone IAA. *Renewable Energy*, 187, 819–828. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.01.108>
- Chen, T., Zhao, Q., Wang, L., Xu, Y., & Wei, W. (2017). Comparative Metabolomic Analysis of the Green Microalga *Chlorella sorokiniana* Cultivated in the Single Culture and a Consortium with Bacteria for Wastewater Remediation. *Applied*

- Biochemistry and Biotechnology*, 183(3), 1062–1075.
<https://doi.org/10.1007/s12010-017-2484-6>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Cobos, Castro, & Cerdeira. (2014). Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodisel de microalgas oleaginosas aisladas del Río Itaya, Loreto, Perú. *Ecología Aplicada*, 13(1–2), 169. <https://doi.org/10.21704/rea.v13i1-2.467>
- Cocci, P., Mosconi, G., Bracchetti, L., Nalocca, J. M., Frapiccini, E., Marini, M., Caprioli, G., Sagratini, G., & Palermo, F. A. (2018). Investigating the potential impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on gene biomarker expression and global DNA methylation in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 619–620, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.118>
- Collins, L., Alvarez, D., & Chauhan, A. (2014). Phycoremediation Coupled with Generation of Value-Added Products. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 342–387). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00015-7>
- Darienko, T., & Pröschold, T. (2015). Genetic variability and taxonomic revision of the genus *Auxenochlorella* (Shihira et Krauss) Kalina et Puncocharova (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 51(2), 394–400. <https://doi.org/10.1111/jpy.12279>
- Dembitsky, V. M. (2022). Hydrobiological Aspects of Fatty Acids: Unique, Rare, and Unusual Fatty Acids Incorporated into Linear and Cyclic Lipopeptides and Their Biological Activity. *Hydrobiology*, 1(3), 331–432. <https://doi.org/10.3390/hydrobiology1030024>
- Elisângela, M. R., Eteiele, G. de M., Cibele, F. de O., Kellen, Z., & Jorge, A. V. C. (2015). Microalgae cultivation for biosurfactant production. *African Journal of Microbiology Research*, 9(47), 2283–2289. <https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7634>
- Fernandes, T., Martel, A., & Cordeiro, N. (2020). Exploring *Pavlova pinguis* chemical diversity: a potentially novel source of high value compounds. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57188-y>
- Fernández, J., Flórez, F., Pereira, S., Rábade, T., Laffon, B., & Méndez, J. (2011). Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 177(1–4), 289–300. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1634-x>

- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. In *Microbiology* (Vol. 156, Issue 3, pp. 609–643).
<https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Giraldo, N. D., Correa, S. M., Arbeláez, A., Figueroa, F. L., Ríos-Esteba, R., & Atehortúa, L. (2021). Reducing self-shading effects in *Botryococcus braunii* cultures: effect of Mg²⁺ deficiency on optical and biochemical properties, photosynthesis and lipidomic profile. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00389-z>
- Guarnieri, M. T., Nag, A., Smolinski, S. L., Darzins, A., Seibert, M., & Pienkos, P. T. (2011). Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025851>
- Guillard, R. R. (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Halaj, M., Paulovičová, E., Paulovičová, L., Jantová, S., Cepák, V., Lukavský, J., & Capek, P. (2019). Extracellular biopolymers produced by Dictyosphaerium family - Chemical and immunomodulative properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1254–1263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.116>
- Hamouda, R. A. E. F., Sorour, N. M., & Yeheia, D. S. (2016). Biodegradation of crude oil by *Anabaena oryzae*, *Chlorella kessleri* and its consortium under mixotrophic conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 112, 128–134.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.001>
- Henley, Hironaka J., Guillou L., Buchheim M., Fawley M., & Fawley K. (2004). Phylogenetic analysis of the Nannochloris like algae and diagnoses of Picochlorum oklahomensis gen. et sp. nov Trebouxiophyceae Chlorophyta. *Phycologia*, 43(6), 641–652.
- Hiraga, Y., Shikano, T., Widiarti, T., & Ohkata, K. (2008). Three new glycolipids with cytolytic activity from cultured marine dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Natural Product Research*, 22(8), 649–657.
<https://doi.org/10.1080/14786410701369417>

- Hossain, Z., Kurihara, H., Hosokawa, M., & Takahashi, K. (2005). Growth inhibition and induction of differentiation and apoptosis mediated by sodium butyrate in Caco-2 cells with algal glycolipids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 41, 154–159.
- Hughes, T. P., Bellwood, D. R., Folke, C., Steneck, R. S., & Wilson, J. (2005). New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 20, Issue 7, pp. 380–386).
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.03.022>
- INVEMAR. (2010). *Informe del estado de los ambientes y recursos marinos y costeros en Colombia: año 2009. Serie de publicaciones periódicas. No. 8.*
- Islam, M. S., & Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 48, Issues 7–8, pp. 624–649).
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.004>
- Iwasaki, A., Ohno, O., Sumimoto, S., Matsubara, T., Shimada, S., Sato, T., & Suenaga, K. (2015). Mebamamides A and B, Cyclic Lipopeptides Isolated from the Green Alga *Derbesia marina*. *Journal of Natural Products*, 78(4), 901–908.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00168>
- Jadeja, Ren, & Zhou. (2012). Chapter 17: Bioremediation with marine algae: A case study of the soda ash industry. In Mason A. (Ed.), *Bioremediation: Biotechnology, engineering and environmental management* (pp. 449–457). Nova Science Publishers, Inc.
- Kandimalla, P., Desi, S., & Vurimindi, H. (2016). Mixotrophic cultivation of microalgae using industrial flue gases for biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9345–9354. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5264-2>
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. ramu, & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. In *Petroleum* (Vol. 4, Issue 3, pp. 241–249). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Kato, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Khan, Karmakar, Das, & Hasan Razu, M. (2016). *Heterotrophic Growth of Microalgae*. www.esciencecentral.org/ebooks
- Khaw, Y. S., Khong, N. M. H., Shaharuddin, N. A., & Yusoff, F. M. (2020). A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an

- emphasis on primers. *Journal of Microbiological Methods*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105890>
- Kim, W., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S. H., Kang, C. M., Kim, D. J., & Kim, S. W. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0612-1>
- Kotzé-Hörstmann, L., Cois, A., Johnson, R., Mabasa, L., Shabalala, S., Van Jaarsveld, P. J., & Sadie-Van Gijsen, H. (2022). Characterization and Comparison of the Divergent Metabolic Consequences of High-Sugar and High-Fat Diets in Male Wistar Rats. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.904366>
- Krienitz, L., Huss, V. A. R., & Bock, C. (2015). Chlorella: 125 years of the green survivalist. In *Trends in Plant Science* (Vol. 20, Issue 2, pp. 67–69). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772–773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043–1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>
- Lortou, U., Panteris, E., & Gkelis, S. (2022). Uncovering New Diversity of Photosynthetic Microorganisms from the Mediterranean Region. *Microorganisms*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081571>
- Luesch, H., Yoshida, W. Y., Moore, R. E., & Paul, V. J. (2000). Apramides A-G, novel lipopeptides from the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. *Journal of Natural Products*, 63(8), 1106–1112. <https://doi.org/10.1021/np000078t>
- Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., & Brahma Prakash, G. P. (2020). Lesson from ecotoxicity: Revisiting the microbial lipopeptides for the management of emerging diseases for crop protection. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>

- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nogle, L. M., Okino, T., & Gerwick, W. H. (2001). Antillatoxin B, a neurotoxic lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, *64*(7), 983–985. <https://doi.org/10.1021/np010107f>
- Olivares, Hugo., Salazar, L., Nájera, M., Godínez, J., & Vega, A. (2018). Lipid metabolism and pro-oxidant/antioxidant balance of *Halamphora oceanica* from the Gulf of Mexico exposed to water accommodated fraction of Maya crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*, 840–851. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.057>
- Olmos, García de Llasera, & Velasco. (2012). Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1262*, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.015>
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. In *Bioresource Technology* (Vol. 244, pp. 1216–1226). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>
- Paniagua, J. de J., Olmos, J., & Morales, E. (2014). Algal and microbial exopolysaccharides: New insights as biosurfactants and bioemulsifiers. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 73, pp. 221–257). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00011-1>
- Parrish, C. C., Bodennec, G., & Gentien, P. (1998). Haemolytic glycolipids from *Gymnodinium* species. *Phytochemistry*, *47*(5), 783–787.
- Patiño, A. D., Montoya-Giraldo, M., Quintero, M., López-Parra, L. L., Blandón, L. M., & Gómez-León, J. (2021). Dereplication of antimicrobial biosurfactants from marine bacteria using molecular networking. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95788-9>
- Paul, K., Gaikwad, M., Choudhary, P., Mohan, N., Pai, P., Patil, S. D., Pawar, Y., Chawande, A., Banerjee, A., Nagle, V., Chelliah, M., Sapre, A., & Dasgupta, S. (2022). Year-round sustainable biomass production potential of *Nannochloris* sp. in outdoor raceway pond enabled through strategic photobiological screening. *Photosynthesis Research*, *154*(3), 303–328. <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00984-x>

- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Poddar, N., Sen, R., & Martin, G. J. O. (2018). Glycerol and nitrate utilisation by marine microalgae *Nannochloropsis salina* and *Chlorella* sp. and associated bacteria during mixotrophic and heterotrophic growth. *Algal Research*, *33*, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.002>
- Priya, M., Gurung, N., Mukherjee, K., & Bose, S. (2014). Microalgae in Removal of Heavy Metal and Organic Pollutants from Soil. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 522–539). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00023-6>
- Reddy, M. M. S., Tiwari, S., & Chauhan, V. S. (2023a). Algal lipids, lipidomics, and biosurfactants. In *Algae Materials: Applications Benefitting Health* (pp. 313–342). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18816-9.00019-8>
- Reddy, M. M. S., Tiwari, S., & Chauhan, V. S. (2023b). Algal lipids, lipidomics, and biosurfactants. In *Algae Materials: Applications Benefitting Health* (pp. 313–342). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18816-9.00019-8>
- Revel, M., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2017). Omics tools: New challenges in aquatic nanotoxicology? In *Aquatic Toxicology* (Vol. 193, pp. 72–85). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.005>
- Romero, Lopez, & Costas. (2014). Chapter 10. Selected microalgae for petroleum bioremediation: Towards a bio-depuration based on Von Neumann-like machines. In Velázquez J. & Muñoz S. (Eds.), *Bioremediation: Processes, challenges and future prospects*. (pp. 211–219). Nova Science Publisher Inc. .
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Salvador, L. A., Biggs, J. S., Paul, V. J., & Luesch, H. (2011). Veraguamides A-G, cyclic hexadepsipeptides from a dolastatin 16-producing cyanobacterium *Symploca* cf. *hydroides* from Guam. *Journal of Natural Products*, *74*(5), 917–927. <https://doi.org/10.1021/np200076t>
- Samanta S., Singh O., & Jain R. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, *20*(6), 243–248.

- Shishlyannikov, S. M., Nikonova, A. A., Klimenkov, I. V., & Gorshkov, A. G. (2017). Accumulation of petroleum hydrocarbons in intracellular lipid bodies of the freshwater diatom *Synedra acus* subsp. *radians*. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(1), 275–283. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7782-y>
- Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 204–232). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>
- Sitachitta, N., Williamson, R. T., & Gerwick, W. H. (2000). Yanucamides A and B, two new depsipeptides from an assemblage of the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix* species. *Journal of Natural Products*, *63*(2), 197–200. <https://doi.org/10.1021/np990466z>
- Smith, D. J., & Underwood, G. J. C. (2000). The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: The effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology*, *36*(2), 321–333. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99148.x>
- Somogyi, B., Felföldi, T., Solymosi, K., Flieger, K., Márialigeti, K., Böddi, B., & Vörös, L. (2013). One step closer to eliminating the nomenclatural problems of minute coccoid green algae: *Pseudochloris wilhelmii*, gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, *48*(4), 427–436. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.854411>
- Subashchandrabose, S. R., Krishnan, K., Gratton, E., Megharaj, M., & Naidu, R. (2014). Potential of fluorescence imaging techniques to monitor mutagenic PAH uptake by microalga. *Environmental Science and Technology*, *48*(16), 9152–9160. <https://doi.org/10.1021/es500387v>
- Subramanian, G., Yadav, G., & Sen, R. (2016). Rationally leveraging mixotrophic growth of microalgae in different photobioreactor configurations for reducing the carbon footprint of an algal biorefinery: A techno-economic perspective. *RSC Advances*, *6*(77), 72897–72904. <https://doi.org/10.1039/c6ra14611b>
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, *56*(4), 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tale, M., Ghosh, S., Kapadnis, B., & Kale, S. (2014). Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresource Technology*, *169*, 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.017>

- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015a). Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 10, pp. 6152–6209). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13106152>
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015b). Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 10, pp. 6152–6209). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13106152>
- Temraleeva, A., Krivina, E., & Boldina, O. (2022). Edaphochloris, gen. nov.: a new genus of soil green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with simple morphology. *Plant Systematics and Evolution*, 308(1). <https://doi.org/10.1007/s00606-021-01795-8>
- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009>
- Tsuge, K., Matsui, K., & Itaya, M. (2007). Production of the non-ribosomal peptide plipastatin in *Bacillus subtilis* regulated by three relevant gene blocks assembled in a single movable DNA segment. *Journal of Biotechnology*, 129(4), 592–603. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.033>
- Velásquez J. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1).
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapon, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. In *Nature Biotechnology* (Vol. 34, Issue 8, pp. 828–837). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., Gottfries, J., Moritz, T., & Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, 80(1), 115–122. <https://doi.org/10.1021/ac0713510>
- Willamme, R., Alsafrá, Z., Arumugam, R., Eppe, G., Remacle, F., Levine, R. D., & Remacle, C. (2015). Metabolomic analysis of the green microalga *Chlamydomonas*

- reinhardtii cultivated under day/night conditions. *Journal of Biotechnology*, 215, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.013>
- Wrasidlo, W., Mielgo, A., Torres, V. A., Barbero, S., Stoletov, K., Suyama, T. L., Klemke, R. L., Gerwick, W. H., Carson, D. A., & Stupack, D. G. (2008). *The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Xaaldi, A., Movafeghi, A., Mohammadi-Nassab, A. D., Abedi, E., & Bahrami, A. (2017). Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1–2), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.045>
- Xu, J., Chen, D., Yan, X., Chen, J., & Zhou, C. (2010). Global characterization of the photosynthetic glycerolipids from a marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 663(1), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.026>
- Zheng, S., Zhou, Q., Chen, C., Yang, F., Cai, Z., Li, D., Geng, Q., Feng, Y., & Wang, H. (2019). Role of extracellular polymeric substances on the behavior and toxicity of silver nanoparticles and ions to green algae *Chlorella vulgaris*. *Science of the Total Environment*, 660, 1182–1190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.067>
- Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>

2. Análisis metabólico del crecimiento heterotrófico de una microalga marina en presencia de petróleo

Resumen

Las microalgas marinas son conocidas por su adaptabilidad bajo factores de estrés abiótico, más aún, en ambientes con presencia de sustancias contaminantes como el petróleo y sus derivados, dicha habilidad es favorecida por la producción de compuestos extracelulares como los biosurfactantes, los cuales son moléculas anfipáticas cuya función es facilitar el traspaso de este tipo de compuestos por las membranas biológicas, al disminuir la tensión superficial, permitiendo su ingreso al interior de la célula, para su posterior metabolismo. En cultivos incubados en condiciones de oscuridad, se ha observado el aumento en la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), debido a que estos microorganismos unicelulares, soportan el estrés de su entorno, con la producción de metabolitos. Con el fin de ahondar en la influencia de compuestos con perfil biosurfactante, en los procesos de biodegradación de petróleo exhibidos por las microalgas marinas, se diseñó un experimento, en el que se analizaron los perfiles cromatográficos, obtenidos de extractos orgánicos extracelulares, libres de células, extraídos con una metodología dirigida a recuperar compuestos lipofílicos, producidos por la microalga *Nannochloris sp.*, con código 69060, incubada bajo dos condiciones diferenciales de iluminación, en luz y oscuridad permanentes, en medio mínimo de sales con el petróleo como la única fuente de carbono. Este análisis comparativo, se realizó, para determinar la influencia del contexto nutricional en el metabolismo de los PAHs. Se aplicó el modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA), a los datos de los metabolitos identificados y se comprobó que el metabolismo de los PAHs presentes en el petróleo es diferente bajo condiciones de luz y oscuridad permanentes. Este conocimiento generado es valioso con miras a lograr potenciar la actividad

biodegradadora de las microalgas cuando se empleen para manejar un vertimiento del petróleo accidental al ambiente.

Palabras clave: estrés abiótico, adaptabilidad, petróleo, biosurfactantes.

Introducción

Las microalgas son organismos cuyo estudio fisiológico y metabólico ha crecido en los últimos años de manera exponencial, debido a que son autótrofos que tienen la capacidad de desarrollarse en entornos adversos como los ambientes marinos caracterizados por su alta salinidad y bajo la exposición a sobreiluminación, en ausencia de nutrientes vitales (Liang et al., 2009), al igual que en presencia de estresores ambientales, como sustancias contaminantes, que se han vuelto cada vez más comunes en los ambientes costeros. Muchas microalgas crecen en condiciones fotoautotróficas, pero se han identificado algunas especies que son capaces de crecer heterotróficamente, usando sustratos orgánicos como fuentes de carbono y de energía. Esta capacidad facilita la expansión de aplicaciones útiles de varias especies que están limitadas por el costo de la autotrofia, debido a que la dependencia de los cultivos en presencia de luz, incrementa el costo de mantenimiento del cultivo, por lo que la explotación de estas microalgas se restringe a pequeños volúmenes (Khan et al., 2016). El crecimiento heterotrófico y el consumo de carbono dependen del transporte o difusión a través de la membrana y del proceso enzimático requerido para su incorporación en el metabolismo de carbono central.

Por su parte, en varios estudios se ha demostrado que los cambios ambientales, como las condiciones nutricionales, intensidad de la luz y la concentración de carbono, pueden afectar el proceso metabólico y la respuesta transcripcional en las microalgas (Chen et al., 2017). Es claro que la composición de la biomasa varía de acuerdo con las condiciones de cultivo. Los ritmos circadianos y el ciclo celular también pueden alterar los componentes de la biomasa y su composición.

(Willamme et al., 2015) realizaron un análisis metabolómico de la composición de biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii*, durante ciclos consecutivos de luz y oscuridad, para determinar si la acumulación de los compuestos de carbono como la clorofila, los ácidos grasos y los aminoácidos libres, está bajo el control de los ritmos circadianos o depende de la división celular. En otros estudios como el de (Chen et al., 2017), en el que realizaron un análisis metabolómico comparativo para determinar la respuesta sinérgica de *Chlorella sorokiniana* con la bacteria *Pseudomonas*, en un consorcio empleado para el tratamiento de aguas residuales, es visible la aplicación de esta ciencia ómica para la resolver preguntas de carácter biológico como las dinámicas de un consorcio microalga/bacteria.

Así, la metabolómica se enfoca en el estudio de las moléculas orgánicas que intervienen en los procesos celulares, esta ciencia de datos engloba el análisis completo de los metabolitos de un espécimen biológico, combinado con química analítica de alto rendimiento y análisis de datos multivariados. Tiene su fundamento en experimentos de identificación molecular como resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (Patiño et al., 2021). A través de este enfoque investigativo se generan medidas cuantitativas de la dinámica en la respuesta metabólica multiparamétrica, por parte de los sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos (Revel et al., 2017). Los productos naturales de los microorganismos, plantas y animales de los ambientes marinos y terrestres son analizados habitualmente usando espectrometría de masas (Wang et al., 2016). Debido a que esta técnica analítica permite medir de manera precisa el peso molecular de un compuesto, generando patrones de abundancias a partir de los iones generados provenientes de moléculas orgánicas en fase gaseosa, estos iones se separan de acuerdo con la relación masa/carga (m/z) y se contabiliza su intensidad (abundancia relativa); con los datos obtenidos se genera un espectro de masas, la relación m/z se representa en el eje horizontal y la abundancia relativa en el eje vertical. Por estas razones, la espectrometría de masas ligada a métodos

de separación en línea, como la cromatografía líquida, es ampliamente usada para el perfilamiento cuantitativo y diferencial de muestras biológicas en investigaciones metabólicas y proteómicas (Pluskal et al., 2010).

Con este contexto, el objetivo de este estudio fue realizar un análisis comparativo de los perfiles metabólicos de la microalga marina *Nannochloris sp.* con código 69060, para determinar la influencia del contexto nutricional en el metabolismo de los PAHs del petróleo. Para esto fueron comparados los extractos orgánicos extracelulares, libres de células, obtenidos a partir de bioensayos de exposición de la microalga *Nannochloris sp.*, a petróleo al 0,5 %, bajo condiciones de luz y oscuridad, en medio mínimo de sales (MMS) sin fuente carbonada.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Inoculo de la cepa algal

Para los ensayos, se empleó la microalga identificada como *Nannochloris sp.*, con código del Museo de Historia Natural Mariana de Colombia Makuriwa, 69060. El inóculo se preparó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, en 20 mL de medio líquido F/2, incubado durante 24 h, a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, en agitación constante a 130 rpm, y con iluminación permanente fluorescente, en una incubadora tipo Revco.

2.1.2 Obtención de cinética de crecimiento

Se realizó la cinética de crecimiento de la microalga 69060, en presencia de petróleo al 1 % (v/v), pues de acuerdo a los resultados de espectroscopía infrarroja (numeral 1.2.2), con esta microalga se encontraron señales que indicaban la presencia de compuestos con perfil biosurfactante. La cinética fue realizada empleando el contador de células automático Countess™ II FL. La microalga fue sembrada en matraces Erlenmeyer de 50 mL, empleando 20 mL de medio mínimo de sales (MMS) suplementado con 200 μL de petróleo, esto con el fin de modelar

el crecimiento de la microalga en un medio de cultivo que tuviera como única fuente de carbono el petróleo. La curva se construyó en agitación constante de 130 rpm, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, dentro de una incubadora tipo Revco, con iluminación fluorescente permanente. Se realizaron tres réplicas del tratamiento y como lo recomiendan (Kim et al., 2012), (Cobos et al., 2014) el conteo celular se desarrolló varias veces, para obtener los valores de la desviación estándar, tomando así varias mediciones de la misma alícuota del cultivo en un día dado, de esta forma se construyó la cinética de crecimiento con las medias obtenidas de las mediciones diarias para cada replica biológica, seguidamente se compilaron los datos diarios obtenidos de cada unidad experimental en un gráfico con su respectiva desviación estándar. Durante 20 días fueron tomados datos de la densidad celular de los cultivos, cada 5 días. Al final del tratamiento se realizó una medición de la densidad celular. Realizando así seguimiento durante 50 días.

2.1.3 Valoración de heterotrofia en presencia de petróleo

Se evaluó el crecimiento en presencia de petróleo al 0,5% (v/v), de la microalga 69060, identificada como *Nannochloris sp.*, incubada en condiciones permanentes de luz y oscuridad, en un medio mínimo de sales (MMS), sin una fuente carbonada adicional al petróleo, la composición de este medio se relaciona en el anexo A, tabla A1.

Inicialmente, se realizaron bioensayos en los que se expuso la microalga, a la presencia de petróleo al 0.5% (v/v), bajo condiciones de incubación diferenciales de luz y oscuridad, en Erlenmeyers de 200 mL conteniendo 100 mL de medio mínimo de sales suplementados con 500 μL de petróleo, se adicionaron 2 mL de inóculo inicial. Los cultivos fueron mantenidos a $22^\circ\text{C} \pm 2$, con una agitación constante de 130 rpm, en una incubadora tipo Revco, hasta que alcanzaron su etapa exponencial en presencia del petróleo, según la curva de crecimiento previamente construida, corresponde al día 13, como se puede apreciar en la figura 8. Las unidades experimentales, de los tratamientos en luz estuvieron todo el

tiempo expuestas a la luz fluorescente, por su parte, las unidades de oscuridad, no se expusieron en ningún momento a luz. Se realizaron cuatro replicas, para cada tratamiento, incubación en luz y en oscuridad. Paralelamente, se realizaron controles de crecimiento, sin presencia del estresor (petróleo), en medio mínimo de sales, en los que también se adicionaron 2 mL del inóculo inicial de la microalga, en Erlenmeyers de 200 mL con 100 mL de medio mínimo de sales, en condiciones de luz y oscuridad, en la misma temperatura y agitación que los tratamientos. Estos controles se realizaron por duplicado. También fue realizado un control negativo (sin inóculo de la microalga), de este control, se realizaron dos réplicas.

2.1.4 Obtención de extractos orgánicos

Inicialmente, se recolectaron los cultivos a los 13 días y fueron centrifugados con un ciclo de 4°C, a 4000 rpm durante 20 min. Para la obtención de los extractos orgánicos extracelulares, se realizó una extracción dirigida a recuperar moléculas lipofílicas, de la solución acuosa. El medio de cultivo de los bioensayos fue centrifugado como lo recomienda (Bauer & Minceva, 2019) este proceso permitió separar también el crudo residual que quedó en los bioensayos. Luego se realizó una extracción líquido – líquido (Olmos et al., 2012), empleando las columnas de Merck EXtrelut® NT 20, que poseen tierra de diatomea como fase estacionaria. Por cada unidad experimental, cada Erlenmeyer de 250 mL, fueron empleadas dos columnas, de esta manera fueron adicionados 20 mL de sobrenadante libre de células, por columna, empleando así 40 mL por unidad experimental para la obtención de los extractos. Se esperó 15 minutos para que los compuestos de interés se adhirieran a cada columna y se emplearon 40 mL de acetato de etilo para la elución. La elución se realizó en tres corridas, inicialmente se usaron 5 mL de acetato de etilo, que fueron incubados 15 minutos, luego se adicionaron otros 15 mL de acetato, después de 10 minutos de incubación, se abrió la llave de la columna para empezar a coleccionar el volumen eluido y al terminar el lapso de incubación, se cerró la llave de la columna nuevamente, finalmente se colocaron

otros 20 mL de acetato de etilo, para completar el volumen recomendado, volumen que también fue incubado durante 15 minutos, antes de la elución completa de los compuestos de la muestra. De esta forma se obtuvo el extracto orgánico, luego se secó en un rotavapor como lo recomienda (Giraldo et al., 2021). Los extractos se pesaron secos, se diluyeron nuevamente en acetato de etilo, con el fin de que todos los extractos quedaran una concentración similar de 1 mg /mL.

2.1.5 Análisis de lipidómica no dirigido con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Los extractos orgánicos extracelulares fueron analizados por LC-MS, con un analizador de tiempo de vuelo GL-LC/MS-QTOF, el cual es un método sensible y rápido que permite determinar los metabolitos producidos en los bioensayos y niveles muy bajos de PAHs (Olmos *et al.*, 2012). Las muestras se analizaron empleando un sistema de cromatografía de líquidos *Agilent Technologies* 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545 con ionización por electrospray. Fue inyectado 1 μ L de las muestras en una columna C18 (100 x 3.0 mm, 2.7 μ m), a 40°C, con una elución en gradiente compuesta de: 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en agua Milli-Q (Fase A) y 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo (Fase B), con un flujo constante de 0,4 mL/min. La condición de elución se aplicó en un gradiente discontinuo así: 10 % Fase B por 5 min, 10-70 % Fase B por 7 min, 70 % Fase B por 5 min, 70-99% Fase B por 4 min y 99% de Fase B por 6 min. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo ESI positivo en *full scan* de 50 a 1200 *m/z*. Con una temperatura del gas de 200°C y a 3500 V. Durante todo el análisis, para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia: *m/z* 121.0509 (C₅H₄N₄), *m/z* 922.0098 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄) en positivo.

2.1.6 Detección, identificación y alineamiento de picos.

Se usó el software MZmine 2.53 para preprocesar los datos crudos, crear una lista de los cromatogramas extraídos y de los espectros de masas consenso, que posteriormente fueron enviados a MetaboAnalyst para su análisis estadístico. Según lo indicado por Pluskal *et al.* (2010) se realizó la detección e identificación de los picos en los cromatogramas provenientes de los extractos analizados con las corridas de LC-MS. En MZmine 2 la identificación de los picos se puede desarrollar a través de una búsqueda de los valores m/z y de los tiempos de retención directamente de la interface de MZmine o enlazándose a recursos online como PubChem o METLIN. Para la obtención de los espectros consenso, el software aplica un algoritmo alineador simple, cuyo propósito es agrupar picos relevantes a través de múltiples muestras, creando una lista maestra de picos, que se va llenando progresivamente, a medida que se alinea cada pico desde la lista de picos obtenidos de las muestras, con el mejor candidato de la lista maestra, usando una ventana de alineamiento de dos dimensiones representada por los umbrales de m/z y el tiempo de retención definidos por el usuario. Al final del alineamiento y de la obtención de los espectros consenso, se obtiene una matriz con las muestras en columnas y las variables (picos) en filas. Las señales de los picos provenientes del blanco de extracción y del control del medio de cultivo con petróleo sin la microalga, fueron borradas de la matriz consenso. Se obtuvo una matriz, que fue exportada en formato csv, delimitado por comas, para poder subirla a la interface MetaboAnalyst.

2.1.7 Filtración y normalización de los datos

Para realizar la filtración y la normalización de los datos se usó el servidor de MetaboAnalyst según (Chong *et al.*, 2019), la cual es una plataforma dedicada al análisis de datos metabólicos a través de una interface web. En la versión actual, se pueden procesar los espectros crudos de MS, aunque por las restricciones ligadas a la banda ancha del internet, es poco práctico cargar gran

cantidad de espectros crudos remotamente a la interface, por lo que el preprocesamiento de los datos se realizó usando el software MZmine, instalado localmente.

Se realizó la filtración de los datos para identificar y remover variables que no son útiles para el modelamiento de los datos, este proceso según (Chong et al., 2019), es recomendado para sets de datos de metabolómica no dirigida, que poseen una gran cantidad de variables, muchas de las cuales son ruido de línea base, por lo que esta filtración mejora los resultados. Las variables no-informativas, se pueden caracterizar en tres grupos, primero, variables de valor muy pequeño, cercanos al límite de detección o de la línea base y se pueden detectar usando media o mediana, segundo, variables cercanas a valores constantes a lo largo del experimento (housekeeping o homeostasis), estas variables se pueden detectar usando desviación estándar o un estimativo robusto como un rango intercuartil, tercero, variables que muestran baja repetitividad, que son detectadas usando muestras de control de calidad. Se usó rango intercuartil para realizar la filtración de los datos y se filtró el 40 % de las variables lo que dependió de la cantidad de variables presentes en la lista de espectros consenso obtenida con MZmine 2

La interface de MetaboAnalyst permite realizar la normalización integral de los datos y su análisis estadístico como funcional, adicionalmente se puede desarrollar un análisis integral con otras ómicas. Se realizó el autoescalado de las muestras, centrado en la media y dividido en la desviación estándar de cada variable. Para la normalización de los espectros, cuyo objetivo es reducir cualquier sesgo sistemático y mejorar la consistencia de los datos, haciendo las muestras comparables entre sí, se probaron los tres métodos para la transformación de variables que posee la interface, transformación logarítmica, transformación basada en raíz cuadrada y transformación con raíz cúbica, con el fin de determinar con cuál transformación se obtenían mejores resultados. Con estas

transformaciones se busca que las variables tengan una distribución más normal o gaussiana, contrario a la distribución asimétrica inicial que exhiben.

2.1.8 Análisis estadístico multivariado

En el desarrollo de este proyecto, la interface MetaboAnalyst se usó para realizar los siguientes análisis estadísticos basados en proyección, para explorar las mediciones de la intensidad de los metabolitos detectados bajo cada condición de iluminación. Se realizó un análisis de componentes principales, que permite obtener una visión general de la varianza de los datos y realizar una detección de los valores extremos, se graficó el 95% de la región de confianza de cada grupo de muestras y los mapas de calor, esta una técnica de visualización que convierte una tabla numérica en un mapa de color 2D, con colores que van desde “calientes” a “fríos”, para generar una visión intuitiva de los valores de los datos, este mapa se construyó empleando técnicas de agrupación jerárquica para reorganizar las columnas/filas de los datos con dendogramas graficados a un lado del gráfico. Finalmente se realizó la aplicación de un modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA), para determinar si había una diferencia entre los metabolitos producidos en los tratamientos de exposición a crudo en condiciones de luz y oscuridad permanentes, este es un método de regresión comúnmente usado en estudios multivariados. Este análisis es una herramienta quimiométrica, que permite modelar la información de datos biológicos y químicos contenida en complejas tablas de datos, generadas en estudios de metabolómica, incluye métodos validados, robustos y eficientes. El gráfico S generado tras la aplicación del modelo a los datos ayuda a identificar significancia estadística y metabolitos significativamente potenciales, bioquímicamente hablando, basado en su contribución al modelo y su fiabilidad (Wiklund et al., 2008). La implementación de este método está basada en el paquete de R *rop/s*. Los metabolitos diferenciales se seleccionaron con base en la combinación de un umbral estadísticamente significativo y según la influencia de las variables (picos)

en la proyección de los valores VIP (variable importance for projection, por sus siglas en inglés) obtenidos del modelo, se consideró un valor $p \leq 0.05$ de las áreas normalizadas de los picos, para realizar la selección como lo indican (Kotzé-Hörstmann et al., 2022)

2.2 Resultados

2.2.1 Cantidad de extracto recuperado de los tratamientos

Al culminar el protocolo aplicado para obtención de los extractos orgánicos relacionado en el numeral 2.1.3 y de secar el extracto en el rotavapor, estos fueron pesados, y se calculó la cantidad de extracto obtenido para cada una de réplicas de los tratamientos, igualmente con las réplicas de los controles, valores que se relacionan en la tabla 4.

Tabla 4. Relación cantidad de extracto orgánico recuperado a partir de los tratamientos y los controles, usando las columnas EXtrelut NT20 para recuperación de sustancias lipofílicas.

Código de muestra	Muestra	Cantidad de extracto recuperado	Procedencia
G1_1	Medio MMS en luz R1	1 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en luz y medio MMS
G1_2	Medio MMS en luz R2	1 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en luz y medio MMS
G1_3	Medio MMS en luz R3	1 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en luz y medio MMS
G1_4	Medio MMS en luz R4	1 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en luz y medio MMS
G2_5	Medio MMS en oscuridad R1	1 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en oscuridad y medio MMS
G2_6	Medio MMS en oscuridad R2	1 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en oscuridad y medio MMS
G2_7	Medio MMS en oscuridad R3	0,5 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en oscuridad y medio MMS
G2_8	Medio MMS en oscuridad R4	1 mg	Tratamiento exposición a crudo incubado en oscuridad y medio MMS
G3_10	MMS Control (+) oscuridad R1	0,6 mg	Control de crecimiento incubado en oscuridad y medio MMS
G3_11.	MMS Control (+) oscuridad R2	0,9 mg	Control de crecimiento incubado en oscuridad y medio MMS

G5_12	MMS Control (-) R1	1 mg	Control medio cultivo solo con petróleo
G3_9	MMS Control (+) luz R2	1 mg	Control de crecimiento incubado en luz y medio MMS
G3_14	MMS Control (+) luz R1	0,4 mg	Control de crecimiento incubado en luz y medio MMS
G5_13	MMS Control (-) R2	1 mg	Control medio cultivo solo con petróleo

2.2.2 Matriz de picos obtenida en MZmine 2

Después de cargar los datos crudos de las corridas de LC-MS en el software MZmine 2, se obtuvo la siguiente matriz, construida con los espectros consenso de los tratamientos de exposición a petróleo y los controles de crecimiento positivo, sin presencia de este estresor. La matriz obtenida tenía 30460 variables (picos).

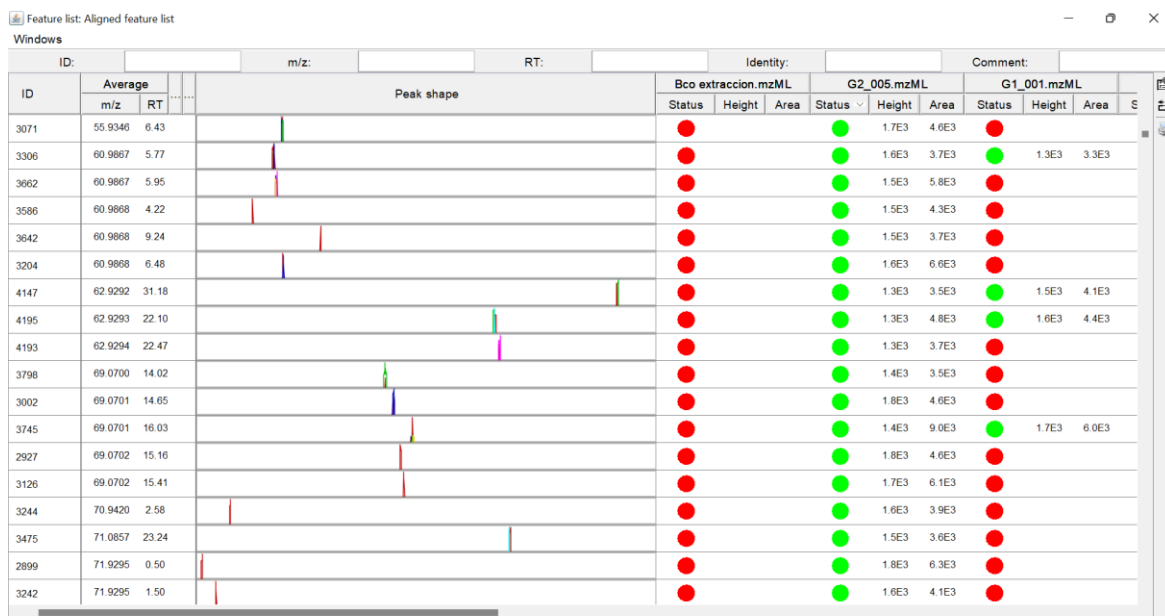


Figura 12. Matriz de picos consenso con datos sobre m/z, tiempo de retención y altura (área) del pico, obtenida con MZmine 2. Se removieron las señales del blanco de extracción y del control del medio de cultivo con petróleo para la construcción del consenso de espectros.

2.2.3 Filtración y normalización de los datos

Después de aplicar una filtración a través del rango intercuantil de los datos, el tamaño de la matriz de espectros disminuyó de 30.460 a 2.500 variables, pues para

matrices con más de 1000 variables el programa realiza una filtración del 40% de éstas. Los mejores resultados después de la transformación aplicada a las variables, se determinaron con la transformación en base log (10). En los gráficos de normalización de las figuras 13 y 14, se muestra la distribución de los datos basados en la estimación de densidad de Kernel, antes y después de la aplicación de la normalización. También se encuentra un gráfico de cajas en el que se muestra la distribución de las variables individuales, antes y después de la normalización. Paralelamente, es posible observar el efecto de la aplicación de la normalización sobre las muestras y sobre las variables.

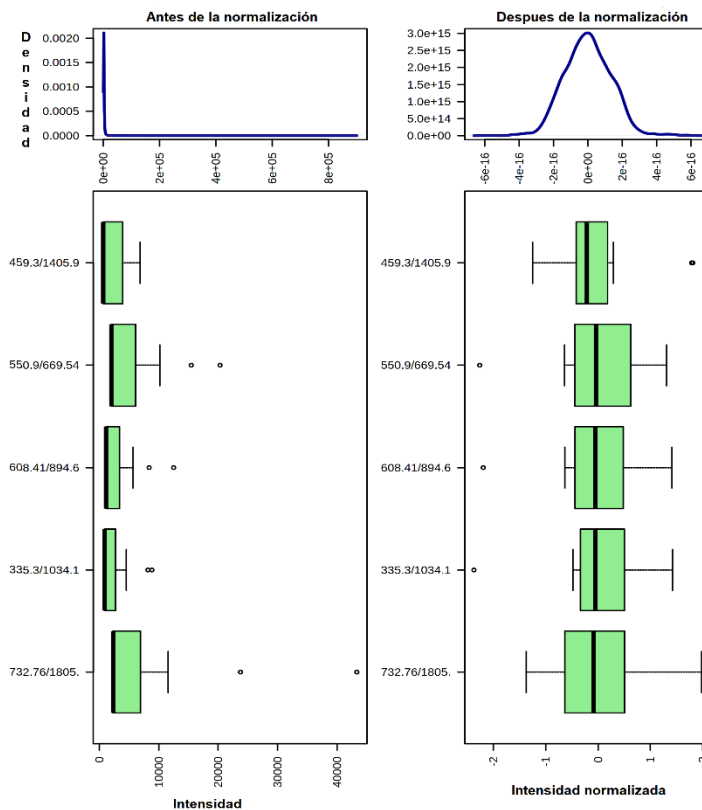


Figura 13. Comparación de la distribución de Kernel para las variables antes y después de aplicar los parámetros de normalización, transformación de los datos en base (log), autoescalado y normalización por suma.

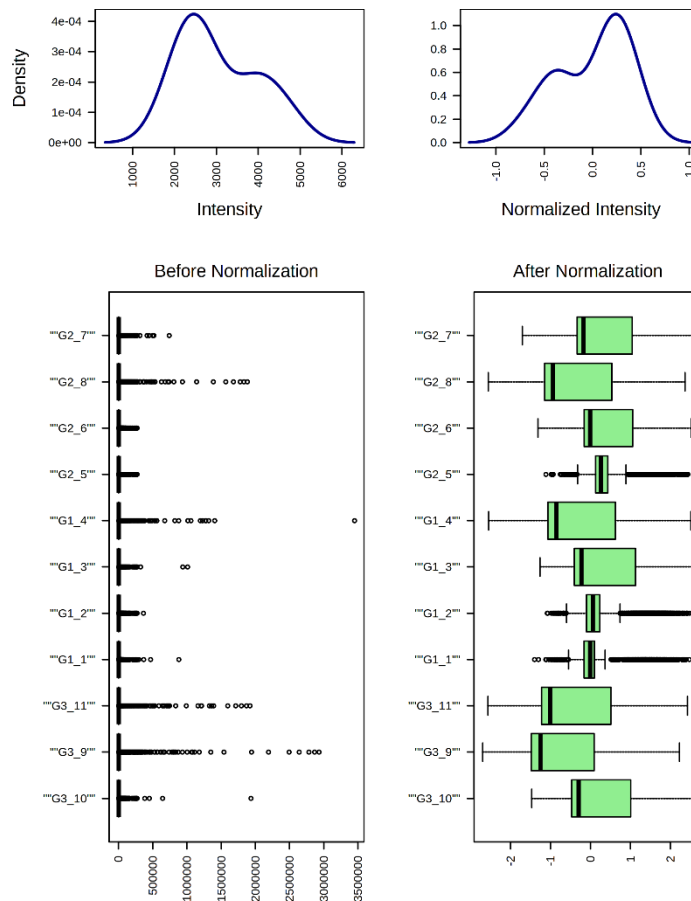


Figura 14. Comparación de la distribución de Kermel para las once muestras antes y después de aplicar los parámetros de normalización, transformación de los datos en base (log), autoescalado y normalización por suma.

2.2.4 Análisis estadístico multivariado

Con respecto al análisis de componentes principales, como los tres componentes iniciales representan niveles similares de varianza en los datos, en la figura 15, se muestra el resultado de la agrupación de las variables en el primer y segundo componente, los cuales agrupan el 28,9 % y el 11.2% de la variación de los datos. El área de cada elipse, que agrupa las réplicas de cada grupo de muestras, indica el 95% de confianza. Se puede observar la tendencia sistemática de los datos a agruparse, pues sobresale la separación entre el grupo control y el grupo de los

tratamientos de exposición a petróleo. También se puede identificar que el grupo de las muestras del tratamiento de exposición a luz y oscuridad se sobrelapan significativamente.

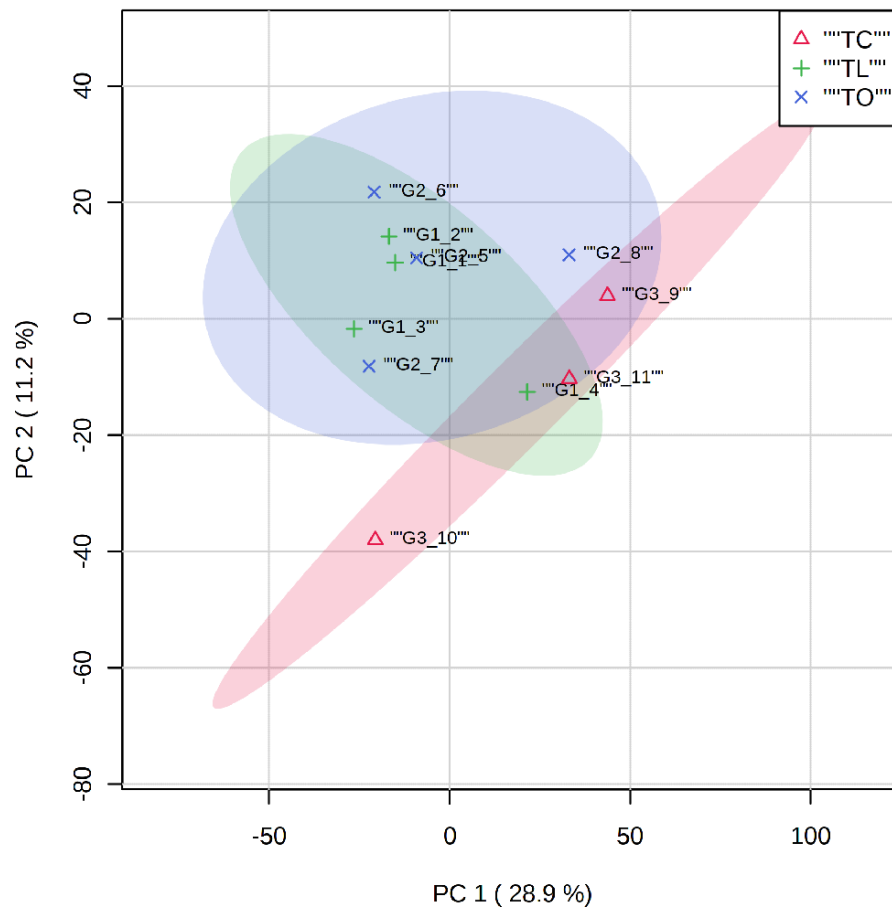


Figura 15. Gráfico 2D, del primer y segundo componente principal, que muestra la variación en las muestras de los tres grupos analizados con LC-MS, TC: tratamiento control sin petróleo, TL: tratamiento de exposición a petróleo incubado en luz y TO: tratamiento de exposición a petróleo incubado en oscuridad.

En el mapa de calor se puede ver que valores de la intensidad de los picos son altos y de qué muestra provienen, es posible distinguir una gama de rojos más marcada sobre el grupo de las muestras control, lo que indica que ese pico tiene

una intensidad baja o no está presente en ese grupo de muestras, mientras que en los grupos de tratamientos predomina la gama de colores amarillos indicando una intensidad alta del pico para estas muestras, especialmente para G1_1, G1_2, G1_3, G2_5, G2_6 y G2_7.

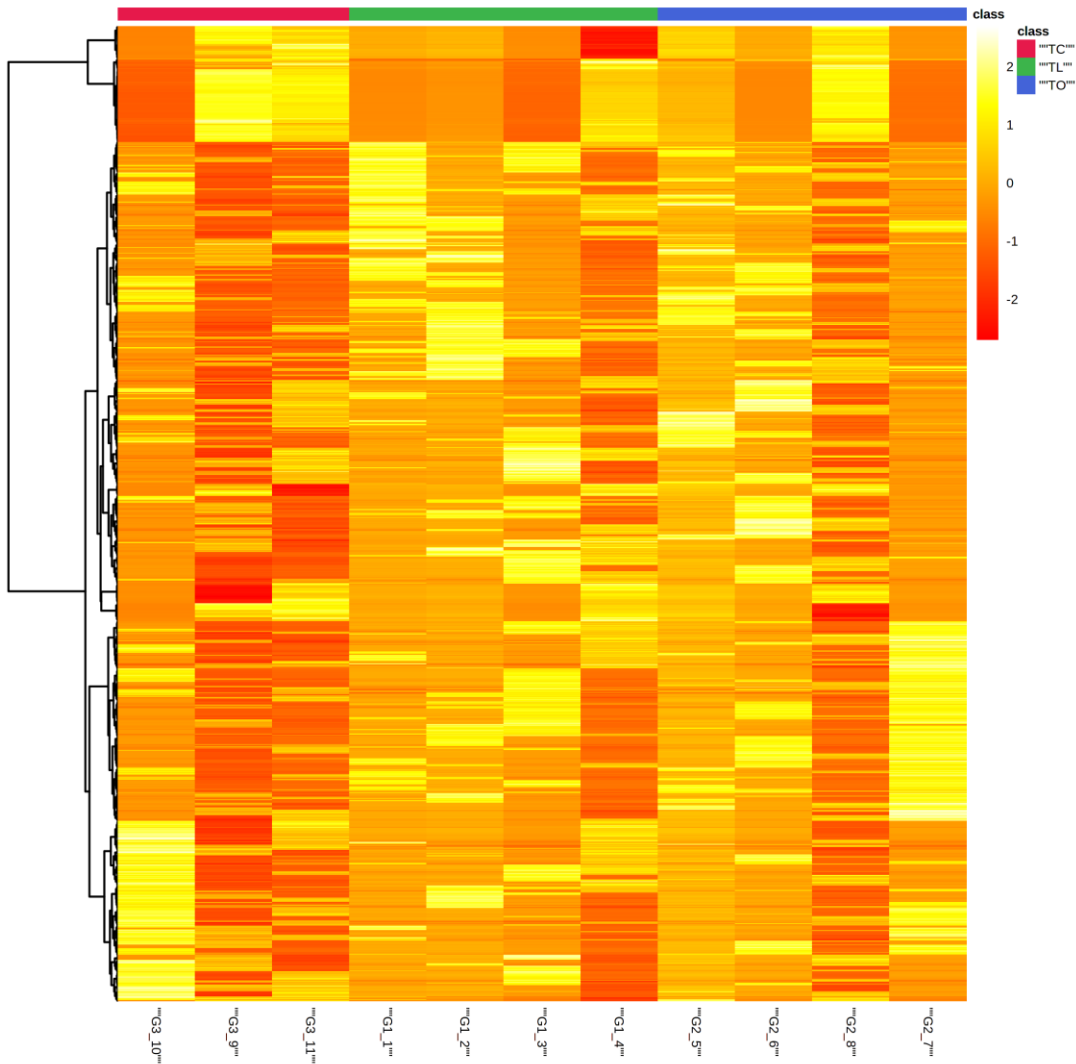


Figura 16. Mapa de calor de los tratamientos de exposición a petróleo y el grupo control. TC: tratamiento control sin petróleo, TL: tratamiento de exposición a petróleo incubado en luz y TO: tratamiento de exposición a petróleo incubado en oscuridad.

En cuanto al modelo OPLS-DA (análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales, por sus siglas en inglés) aplicado a la matriz consenso de los picos obtenidos solo a partir de los tratamientos de exposición a luz y oscuridad permanentes, en la que se removieron las señales (picos) provenientes de los controles de crecimiento, se puede observar en el gráfico S de la figura 17, que las muestras de ambos tratamientos se separan muy bien, sugiriendo que el metabolismo en presencia de petróleo se ve afectado por la condición de iluminación. En este gráfico se visualiza la covarianza y la correlación entre los metabolitos y el modelo designado. En el primer componente predictivo, el T score, conocido también como la variación correlacionada, se encuentra la separación generada por la aplicación del modelo y representa el 14 % de la variación, mientras que la variación que no está relacionada con la separación de las clases, en este caso, con la condición de incubación, luz u oscuridad, se observa en el componente ortogonal, también referida como la variación no correlacionada y representa el 13 % de la variación.

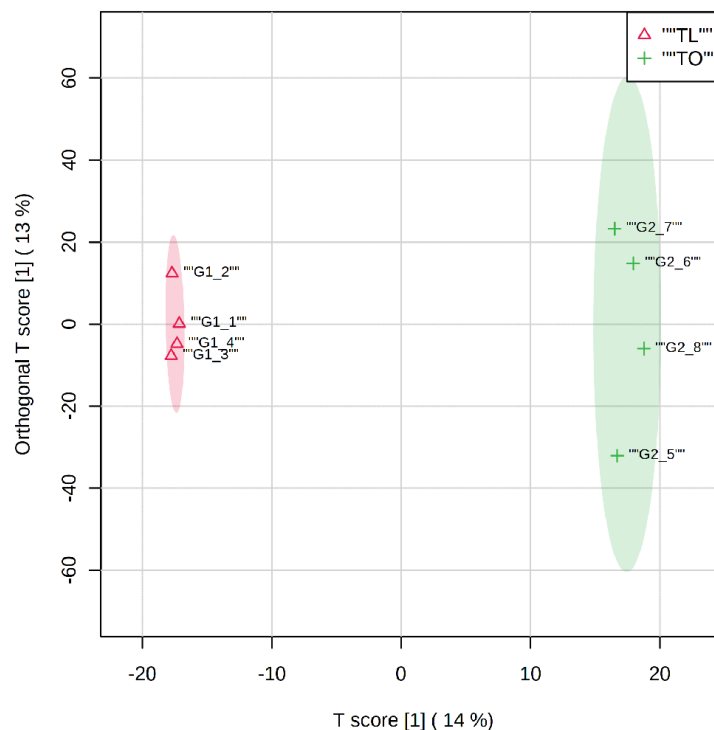


Figura 17. Gráfico S del modelo OPLS-DA aplicado a los espectros obtenidos del tratamiento de exposición a petróleo en luz y oscuridad permanentes.

Se puede observar que las réplicas del tratamiento de oscuridad exhiben una variación en el componente ortogonal, que no está relacionada con la incubación en luz y oscuridad, mayor que las réplicas del tratamiento de luz.

Los valores R^2X y R^2Y representan los coeficientes explicativos del modelo para las matrices X y Y mientras que el parámetro Q^2 se usa para estimar si el modelo está sobrecargado y su habilidad predictiva. En la figura 18 se encuentran los valores de estos coeficientes del modelo aplicado a los datos de los tratamientos de exposición a petróleo en luz y oscuridad, indicando su buen ajuste. Cada punto del gráfico S es una muestra con parámetros R^2X , R^2Y y Q^2 .

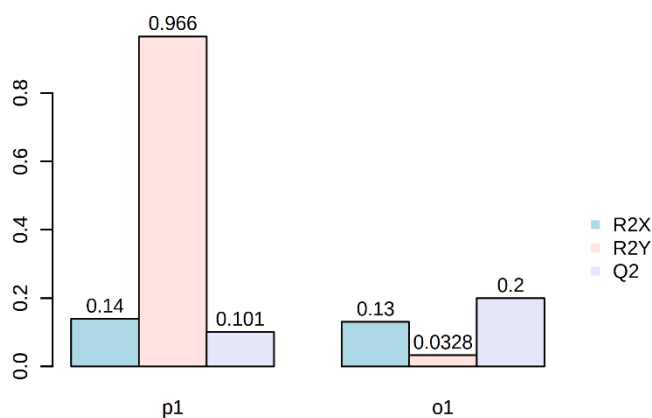


Figura 18. Valores de R^2X , R^2Y y Q^2 , después de la aplicación del modelo OPLS-DA a los datos de los tratamientos de exposición a petróleo en luz y oscuridad.

Después de la aplicación del modelo OPLS-DA y de la obtención de los valores VIP, para los metabolitos detectados, (Fig. 19) se observa que hay una presencia mayor de compuestos lipofílicos en los tratamientos de oscuridad que en los tratamientos de luz. Dentro de los compuestos identificados a través de LC-MS, se

evidencia la presencia de la surfactina C14i monometil ester, que posee un m/z de 1036.69 y un tiempo de retención de 26.49 min.

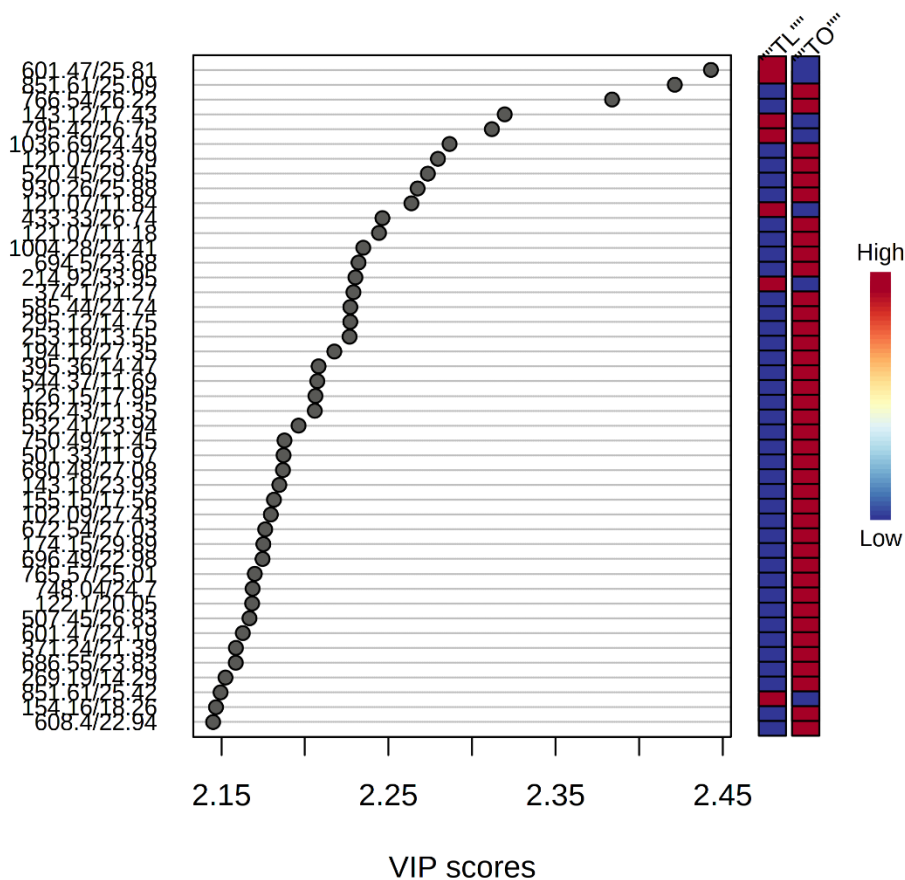


Figura 19. Gráfica de los valores VIP calculados a los metabolitos detectados bajo cada condición de incubación con la aplicación del modelo OPLS-DA. En el eje Y se encuentran los metabolitos de naturaleza lipídica identificados, con su m/z y tiempo de retención. TL: Tratamiento de exposición a crudo, incubado en luz. TO: Tratamiento de exposición a crudo incubado en oscuridad.

1.2.4 Obtención de cinética de crecimiento

En la cinética de crecimiento de la microalga 69060 (Figura 8), empleando medio mínimo de sales suplementado con petróleo al 1 %, se pueden observar las fases típicas de crecimiento de los microorganismos.

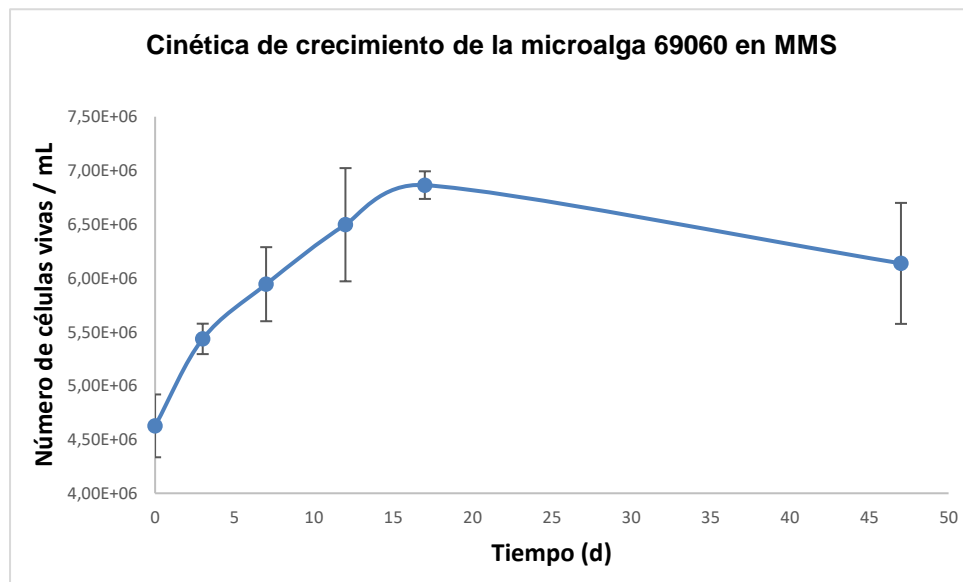


Figura 8. Cinética de crecimiento de la microalga 69060 en medio mínimo de sales (MMS)

Discusión de resultados

Según lo observado en el análisis de componentes principales de la figura 15 y la aplicación del modelo OPLS-DA a los datos de los tratamientos de exposición a petróleo en la figura 17, es claro que la condición de incubación, induce cambios en la forma en la que se metabolizan el petróleo. Así pues, el crecimiento en presencia de petróleo, se ve afectado por la disponibilidad de luz. Sea en incubación con luz permanente, en la que la microalga realiza un metabolismo mixotrófico en la presencia de petróleo, pues tiene la posibilidad de usar la luz para

la generación de energía, al igual que puede consumir el carbono orgánico del petróleo para su crecimiento, ya que el medio mínimo de sales no tiene ningún aporte de fuente carbonatada, al igual que en incubación en oscuridad, condición bajo la cual la microalga realiza un metabolismo completamente heterotrófico puesto que no tiene la posibilidad de captar luz para generar energía. Como lo indica el análisis estadístico multivariado desarrollado, es claro que el perfil lipidoma recuperado de ambos tratamientos de exposición es diferente, lo cual es similar a lo reportado por autores como (Willamme et al., 2015 y (Chen et al., 2017) sobre la influencia de los cambios ambientales, la intensidad de luz y la condición nutricional sobre la respuesta metabólica inducida.

En la gráfica de agrupamiento por componentes principales, figura 15, en la que sobresale la réplica G1_4, que es una réplica del tratamiento de exposición a petróleo incubada en luz, la cual se ubica muy cerca de los réplicas del grupo control, que no tenían petróleo, el agrupamiento de esta réplica, fuera de lo esperado según las condiciones de iluminación del experimento, puede deberse a la desviación instrumental, los artefactos y otro tipo de variación experimental que en ocasiones puede divergir el enfoque de un modelo de agrupamiento por componentes principales a una variación sistemática no relacionada con la pregunta biológica de interés (Wiklund et al., 2008), en estos casos surge la necesidad de un método a priori, que reenfoque el análisis hacia el estudio de los objetivos de interés como el análisis OPLS-DA. La información a priori, constituye un dato extra en la tabla, en donde las columnas indican información de las muestras, dato que puede ser un valor discreto o continuo. Los modelos multivariados tienen la ventaja que permiten detectar relaciones entre variables correlacionadas y este es el caso de los estudios de metabolómica. Por lo tanto, este modelo tiene la ventaja adicional que separa la variación predictiva de la variación ortogonal y puede ser estudiada e interpretada separadamente. Lo anterior se hace evidente en la figura 17, en donde vemos la separación y

agrupamiento de las réplicas de los tratamientos de exposición, dependiendo completamente de la condición de iluminación.

Cómo se observa en el mapa de calor (Fig. 16), en el grupo del tratamiento control, el cual era solo microalga sin exposición a petróleo, la intensidad de los picos es menor que en los tratamientos de exposición, lo que puede deberse a dos factores, primero a la presencia de subproductos del metabolismo del petróleo en los tratamientos de exposición o debido a la presencia de moléculas anfipáticas con perfil biosurfactante, esto teniendo en cuenta que en el método de obtención del extracto orgánico, se implementó el uso de columnas que permiten la recuperación de moléculas lipofílicas a partir de las muestras, también es importante resaltar en este aspecto, como se reporta en el numeral 2.1.5 de la metodología, que para la generación de la matriz consenso fueron borradas las señales pertenecientes al control (-) que solo tenía el medio de cultivo con 200 μ L de petróleo, por lo que se infiere que parte de las señales recuperadas de compuestos lipídicos en las muestras de los tratamientos de exposición, pertenecen a los subproductos metabólicos de los PAHs del petróleo. Así, la detección de una intensidad mayor en los picos de los metabolitos detectados en los tratamientos de exposición relacionada a su vez con una abundancia relativa más alta indica en primer lugar la presencia de una respuesta metabólica inducida por la presencia del petróleo.

Por su parte autores como (Xu et al., 2010) resaltan la pertinencia de usar Q – TOF MS con un instrumento cuadruple como una metodología que puede fragmentar y dar información parental de los lípidos en una única corrida cromatográfica.

3 Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

- De las cinco microalgas evaluadas en el ensayo de tolerancia a hidrocarburos empleando crudo aceitoso al 1%, tres mostraron ser las más tolerantes, dos de ellas fueron identificadas como miembros del género *Nannochloris sp.* (69060 y 69061), mientras que la microalga con código 69055, se agrupó en un clado monofilético la especie tipo recientemente reportada como *Nomia picochloropsia*.
- La microalga con código 69060 fue seleccionada como la más tolerante a la presencia de hidrocarburos, con base en los análisis espectroscópicos, se conoció su cinética de crecimiento durante cincuenta días y se observaron las tres fases del ciclo celular. Adicionalmente, a partir de cultivos de esta microalga, fue obtenido un extracto rico en biosurfactantes y los análisis exploratorios por técnicas metabolómicas indican la presencia del lipopéptido plipastatina reportado con posibles usos terapéuticos y que para este estudio puede ser uno de los responsables de la tolerancia alta que presenta la microalga a los hidrocarburos y su posible incorporación al interior de la célula.
- La disponibilidad de luz puede afectar los procesos metabólicos; en la respuesta de la microalga marina *Nannochloris sp.* 69060, ante la presencia de un estresor en el medio, como el petróleo, se evidenció que en la condición de oscuridad hay una mayor producción de sustancias lipídicas.
- El modelo OPLS-DA aplicado a los espectros obtenidos de los tratamientos de luz y oscuridad en presencia de petróleo, sugiere que la condición de iluminación bajo la cual se encuentran las células de la microalga marina *Nannochloris sp.*, determina los metabolitos que se generan ante la presencia de petróleo en el medio.

3.2 Recomendaciones

Es recomendable el desarrollo de proyectos a futuro que permitan caracterizar la actividad enzimática en los tratamientos de exposición a petróleo, pues el alcance del presente proyecto se enfocó en la obtención de los compuestos extracelulares tipo biosurfactanes, lo que hace necesario ahondar en el factor enzimático que les permite a las microalgas adaptarse y tolerar la presencia de contaminantes como el petróleo en su entorno.

De la misma manera es pertinente el desarrollo de estudios que abarquen el comportamiento de las microalgas desde otras ómicas, como la transcriptómica. Con la que se podría llegar a realizar acercamientos a la expresión diferencial de genes en los tratamientos de exposición.

Bibliografía

- Almaliti, J., Malloy, K. L., Glukhov, E., Spadafora, C., Gutiérrez, M., & Gerwick, W. H. (2017). Dudawalamides A-D, Antiparasitic Cyclic Depsipeptides from the Marine Cyanobacterium *Moorea producens*. *Journal of Natural Products*, *80*(6), 1827–1836. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00034>
- Ayala, & Dussán. (2018). *Bioprospection for petroleum hydrocarbon bioremediating microorganisms in hypersaline environments and barium-resistant microbiota in oil exploitation wastewater*. Universidad de los Andes.
- Bauer, A., & Minceva, M. (2019). Direct extraction of astaxanthin from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* using liquid-liquid chromatography. *RSC Advances*, *9*(40), 22779–22789. <https://doi.org/10.1039/c9ra03263k>
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., & Kovar, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: Achievements, potential and possible limitations. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 91, Issue 1, pp. 31–46). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3311-6>
- Bussa, M., Eisen, A., Zollfrank, C., & Röder, H. (2019). Life cycle assessment of microalgae products: State of the art and their potential for the production of polylactid acid. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 213, pp. 1299–1312). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.048>
- Carrera, D., Mateos, A., López, V., & Costas, E. (2010). Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*, *97*(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.016>
- Castillo, Mugica V., Roldán T., Olgúin P., & Castorena G. (2021). Modification of wettability and reduction of interfacial tension mechanisms involved in the release and enhanced biodegradation of heavy oil by a biosurfactant. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, *20*(3). <https://doi.org/10.24275/RMIQ/IA2427>
- Chang, W., Li, Y., Qu, Y., Liu, Y., Zhang, G., Zhao, Y., & Liu, S. (2022). Mixotrophic cultivation of microalgae to enhance the biomass and lipid production with synergistic effect of red light and phytohormone IAA. *Renewable Energy*, *187*, 819–828. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.01.108>

- Chen, T., Zhao, Q., Wang, L., Xu, Y., & Wei, W. (2017). Comparative Metabolomic Analysis of the Green Microalga *Chlorella sorokiniana* Cultivated in the Single Culture and a Consortium with Bacteria for Wastewater Remediation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(3), 1062–1075. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2484-6>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Cobos, Castro, & Cerdeira. (2014). Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del Río Itaya, Loreto, Perú. *Ecología Aplicada*, 13(1–2), 169. <https://doi.org/10.21704/rea.v13i1-2.467>
- Cocci, P., Mosconi, G., Bracchetti, L., Nalocca, J. M., Frapiccini, E., Marini, M., Caprioli, G., Sagratini, G., & Palermo, F. A. (2018). Investigating the potential impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on gene biomarker expression and global DNA methylation in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 619–620, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.118>
- Collins, L., Alvarez, D., & Chauhan, A. (2014). Phycoremediation Coupled with Generation of Value-Added Products. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 342–387). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00015-7>
- Darienko, T., & Pröschold, T. (2015). Genetic variability and taxonomic revision of the genus *Auxenochlorella* (Shihira et Krauss) Kalina et Puncocharova (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 51(2), 394–400. <https://doi.org/10.1111/jpy.12279>
- Dembitsky, V. M. (2022). Hydrobiological Aspects of Fatty Acids: Unique, Rare, and Unusual Fatty Acids Incorporated into Linear and Cyclic Lipopeptides and Their Biological Activity. *Hydrobiology*, 1(3), 331–432. <https://doi.org/10.3390/hydrobiology1030024>
- Elisângela, M. R., Etiele, G. de M., Cibele, F. de O., Kellen, Z., & Jorge, A. V. C. (2015). Microalgae cultivation for biosurfactant production. *African Journal of Microbiology Research*, 9(47), 2283–2289. <https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7634>
- Fernandes, T., Martel, A., & Cordeiro, N. (2020). Exploring *Pavlova pinguis* chemical diversity: a potentially novel source of high value compounds. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57188-y>
- Fernández, J., Flórez, F., Pereira, S., Rábade, T., Laffon, B., & Méndez, J. (2011). Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment.

- Environmental Monitoring and Assessment*, 177(1–4), 289–300.
<https://doi.org/10.1007/s10661-010-1634-x>
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. In *Microbiology* (Vol. 156, Issue 3, pp. 609–643).
<https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Giraldo, N. D., Correa, S. M., Arbeláez, A., Figueroa, F. L., Ríos-Esteba, R., & Atehortúa, L. (2021). Reducing self-shading effects in *Botryococcus braunii* cultures: effect of Mg²⁺ deficiency on optical and biochemical properties, photosynthesis and lipidomic profile. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00389-z>
- Guarnieri, M. T., Nag, A., Smolinski, S. L., Darzins, A., Seibert, M., & Pienkos, P. T. (2011). Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025851>
- Guillard, R. R. (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Halaj, M., Paulovičová, E., Paulovičová, L., Jantová, S., Cepák, V., Lukavský, J., & Capek, P. (2019). Extracellular biopolymers produced by Dictyosphaerium family - Chemical and immunomodulative properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1254–1263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.116>
- Hamouda, R. A. E. F., Sorour, N. M., & Yeheia, D. S. (2016). Biodegradation of crude oil by *Anabaena oryzae*, *Chlorella kessleri* and its consortium under mixotrophic conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 112, 128–134.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.001>
- Henley, Hironaka J., Guillou L., Buchheim M., Fawley M., & Fawley K. (2004). Phylogenetic analysis of the Nannochloris like algae and diagnoses of Picochlorum oklahomensis gen. et sp. nov Trebouxiophyceae Chlorophyta. *Phycologia*, 43(6), 641–652.
- Hiraga, Y., Shikano, T., Widiati, T., & Ohkata, K. (2008). Three new glycolipids with cytolytic activity from cultured marine dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Natural Product Research*, 22(8), 649–657.
<https://doi.org/10.1080/14786410701369417>

- Hossain, Z., Kurihara, H., Hosokawa, M., & Takahashi, K. (2005). Growth inhibition and induction of differentiation and apoptosis mediated by sodium butyrate in Caco-2 cells with algal glycolipids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 41, 154–159.
- Hughes, T. P., Bellwood, D. R., Folke, C., Steneck, R. S., & Wilson, J. (2005). New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 20, Issue 7, pp. 380–386).
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.03.022>
- INVEMAR. (2010). *Informe del estado de los ambientes y recursos marinos y costeros en Colombia: año 2009. Serie de publicaciones periódicas. No. 8.*
- Islam, M. S., & Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 48, Issues 7–8, pp. 624–649).
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.004>
- Iwasaki, A., Ohno, O., Sumimoto, S., Matsubara, T., Shimada, S., Sato, T., & Suenaga, K. (2015). Mebamamides A and B, Cyclic Lipopeptides Isolated from the Green Alga *Derbesia marina*. *Journal of Natural Products*, 78(4), 901–908.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00168>
- Jadeja, Ren, & Zhou. (2012). Chapter 17: Bioremediation with marine algae: A case study of the soda ash industry. In Mason A. (Ed.), *Bioremediation: Biotechnology, engineering and environmental management* (pp. 449–457). Nova Science Publishers, Inc.
- Kandimalla, P., Desi, S., & Vurimindi, H. (2016). Mixotrophic cultivation of microalgae using industrial flue gases for biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9345–9354. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5264-2>
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. ramu, & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. In *Petroleum* (Vol. 4, Issue 3, pp. 241–249). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Khan, Karmakar, Das, & Hasan Razu, M. (2016). *Heterotrophic Growth of Microalgae*. www.esciencecentral.org/ebooks
- Khaw, Y. S., Khong, N. M. H., Shaharuddin, N. A., & Yusoff, F. M. (2020). A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an

- emphasis on primers. *Journal of Microbiological Methods*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105890>
- Kim, W., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S. H., Kang, C. M., Kim, D. J., & Kim, S. W. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0612-1>
- Kotzé-Hörstmann, L., Cois, A., Johnson, R., Mabasa, L., Shabalala, S., Van Jaarsveld, P. J., & Sadie-Van Gijsen, H. (2022). Characterization and Comparison of the Divergent Metabolic Consequences of High-Sugar and High-Fat Diets in Male Wistar Rats. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.904366>
- Krienitz, L., Huss, V. A. R., & Bock, C. (2015). Chlorella: 125 years of the green survivalist. In *Trends in Plant Science* (Vol. 20, Issue 2, pp. 67–69). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772–773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043–1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>
- Lortou, U., Panteris, E., & Gkelis, S. (2022). Uncovering New Diversity of Photosynthetic Microorganisms from the Mediterranean Region. *Microorganisms*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081571>
- Luesch, H., Yoshida, W. Y., Moore, R. E., & Paul, V. J. (2000). Apramides A-G, novel lipopeptides from the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. *Journal of Natural Products*, 63(8), 1106–1112. <https://doi.org/10.1021/np000078t>
- Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., & Brahma Prakash, G. P. (2020). Lesson from ecotoxicity: Revisiting the microbial lipopeptides for the management of emerging diseases for crop protection. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies.

- Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nogle, L. M., Okino, T., & Gerwick, W. H. (2001). Antillatoxin B, a neurotoxic lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 64(7), 983–985. <https://doi.org/10.1021/np010107f>
- Olivares, Hugo., Salazar, L., Nájera, M., Godínez, J., & Vega, A. (2018). Lipid metabolism and pro-oxidant/antioxidant balance of *Halamphora oceanica* from the Gulf of Mexico exposed to water accommodated fraction of Maya crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 840–851. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.057>
- Olmos, García de Llasera, & Velasco. (2012). Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1262, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.015>
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. In *Bioresource Technology* (Vol. 244, pp. 1216–1226). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>
- Paniagua, J. de J., Olmos, J., & Morales, E. (2014). Algal and microbial exopolysaccharides: New insights as biosurfactants and bioemulsifiers. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 73, pp. 221–257). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00011-1>
- Parrish, C. C., Bodennec, G., & Gentien, P. (1998). Haemolytic glycolipids from *Gymnodinium* species. *Phytochemistry*, 47(5), 783–787.
- Patiño, A. D., Montoya-Giraldo, M., Quintero, M., López-Parra, L. L., Blandón, L. M., & Gómez-León, J. (2021). Dereplication of antimicrobial biosurfactants from marine bacteria using molecular networking. *Scientific Reports*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-95788-9>
- Paul, K., Gaikwad, M., Choudhary, P., Mohan, N., Pai, P., Patil, S. D., Pawar, Y., Chawande, A., Banerjee, A., Nagle, V., Chelliah, M., Sapre, A., & Dasgupta, S. (2022). Year-round sustainable biomass production potential of *Nannochloris* sp. in outdoor raceway pond enabled through strategic photobiological screening. *Photosynthesis Research*, 154(3), 303–328. <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00984-x>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based

- molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Poddar, N., Sen, R., & Martin, G. J. O. (2018). Glycerol and nitrate utilisation by marine microalgae *Nannochloropsis salina* and *Chlorella* sp. and associated bacteria during mixotrophic and heterotrophic growth. *Algal Research*, 33, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.002>
- Priya, M., Gurung, N., Mukherjee, K., & Bose, S. (2014). Microalgae in Removal of Heavy Metal and Organic Pollutants from Soil. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 522–539). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00023-6>
- Reddy, M. M. S., Tiwari, S., & Chauhan, V. S. (2023a). Algal lipids, lipidomics, and biosurfactants. In *Algae Materials: Applications Benefitting Health* (pp. 313–342). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18816-9.00019-8>
- Revel, M., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2017). Omics tools: New challenges in aquatic nanotoxicology? In *Aquatic Toxicology* (Vol. 193, pp. 72–85). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.005>
- Romero, Lopez, & Costas. (2014). Chapter 10. Selected microalgae for petroleum bioremediation: Towards a bio-depuration based on Von Neumann-like machines. In Velázquez J. & Muñoz S. (Eds.), *Bioremediation: Processes, challenges and future prospects*. (pp. 211–219). Nova Science Publisher Inc. .
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Salvador, L. A., Biggs, J. S., Paul, V. J., & Luesch, H. (2011). Veraguamides A-G, cyclic hexadepsipeptides from a dolastatin 16-producing cyanobacterium *Symploca* cf. *hydroides* from Guam. *Journal of Natural Products*, 74(5), 917–927. <https://doi.org/10.1021/np200076t>
- Samanta S., Singh O., & Jain R. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6), 243–248.
- Shishlyannikov, S. M., Nikonova, A. A., Klimenkov, I. V., & Gorshkov, A. G. (2017). Accumulation of petroleum hydrocarbons in intracellular lipid bodies of the freshwater diatom *Synedra acus* subsp. *radians*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 275–283. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7782-y>
- Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Microbial Biodegradation*

- and Bioremediation* (pp. 204–232). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>
- Sitachitta, N., Williamson, R. T., & Gerwick, W. H. (2000). Yanucamides A and B, two new depsipeptides from an assemblage of the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix* species. *Journal of Natural Products*, *63*(2), 197–200. <https://doi.org/10.1021/np990466z>
- Smith, D. J., & Underwood, G. J. C. (2000). The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: The effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology*, *36*(2), 321–333. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99148.x>
- Somogyi, B., Felföldi, T., Solymosi, K., Flieger, K., Márialigeti, K., Böddi, B., & Vörös, L. (2013). One step closer to eliminating the nomenclatural problems of minute coccoid green algae: *Pseudochloris wilhelmii*, gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, *48*(4), 427–436. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.854411>
- Subashchandrabose, S. R., Krishnan, K., Gratton, E., Megharaj, M., & Naidu, R. (2014). Potential of fluorescence imaging techniques to monitor mutagenic PAH uptake by microalga. *Environmental Science and Technology*, *48*(16), 9152–9160. <https://doi.org/10.1021/es500387v>
- Subramanian, G., Yadav, G., & Sen, R. (2016). Rationally leveraging mixotrophic growth of microalgae in different photobioreactor configurations for reducing the carbon footprint of an algal biorefinery: A techno-economic perspective. *RSC Advances*, *6*(77), 72897–72904. <https://doi.org/10.1039/c6ra14611b>
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, *56*(4), 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tale, M., Ghosh, S., Kapadnis, B., & Kale, S. (2014). Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresource Technology*, *169*, 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.017>
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015a). Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 10, pp. 6152–6209). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13106152>
- Temraleeva, A., Krivina, E., & Boldina, O. (2022). *Edaphochloris*, gen. nov.: a new genus of soil green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with simple morphology. *Plant Systematics and Evolution*, *308*(1). <https://doi.org/10.1007/s00606-021-01795-8>

- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepico, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009>
- Tsuge, K., Matsui, K., & Itaya, M. (2007). Production of the non-ribosomal peptide plipastatin in *Bacillus subtilis* regulated by three relevant gene blocks assembled in a single movable DNA segment. *Journal of Biotechnology*, 129(4), 592–603.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.033>
- Velásquez J. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1).
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapon, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. In *Nature Biotechnology* (Vol. 34, Issue 8, pp. 828–837). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., Gottfries, J., Moritz, T., & Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, 80(1), 115–122.
<https://doi.org/10.1021/ac0713510>
- Willamme, R., Alsafr, Z., Arumugam, R., Eppe, G., Remacle, F., Levine, R. D., & Remacle, C. (2015). Metabolomic analysis of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under day/night conditions. *Journal of Biotechnology*, 215, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.013>
- Wrasidlo, W., Mielgo, A., Torres, V. A., Barbero, S., Stoletov, K., Suyama, T. L., Klemke, R. L., Gerwick, W. H., Carson, D. A., & Stupack, D. G. (2008). *The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Xaaldi, A., Movafeghi, A., Mohammadi-Nassab, A. D., Abedi, E., & Bahrami, A. (2017). Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1–2), 286–290.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.045>
- Xu, J., Chen, D., Yan, X., Chen, J., & Zhou, C. (2010). Global characterization of the photosynthetic glycerolipids from a marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-

- time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 663(1), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.026>
- Zheng, S., Zhou, Q., Chen, C., Yang, F., Cai, Z., Li, D., Geng, Q., Feng, Y., & Wang, H. (2019). Role of extracellular polymeric substances on the behavior and toxicity of silver nanoparticles and ions to green algae *Chlorella vulgaris*. *Science of the Total Environment*, 660, 1182–1190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.067>
- Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>

A. Anexo: Composición y preparación de los medios de cultivo empleados

Tabla A1. Composición y preparación del medio de cultivo F/2 según Gillard R. 1975.

1. Solución de nutrientes mayores	Fórmula química	Concentración final (g/L)
1.1 Nitrato de sodio	NaNO ₃	75
1.2 Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	5
1.3 Silicato de sodio metasoluble	Na ₂ SiO ₃ • 9H ₂ O	30
Tomar 75 g NaNO ₃ + 5 g NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O y llevar a 1 L de agua destilada. La solución de silicatos solo se prepara para cultivar diatomeas en 1 L de agua destilada aparte.		
2. Solución de metales traza	Fórmula química	Concentración final (g/100mL)
2.1 Soluciones primarias		

2.1.1 Sulfato cúprico, cristales finos	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,98
2.1.2 Sulfato de zinc, cristales finos	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,20
2.1.3 Cloruro de cobalto, cristales finos	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
2.1.4 Cloruro de manganeso, cristales finos	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18
2.1.5 Molibdato de sodio, cristales finos	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,63
2.2 Soluciones secundarias	Concentración final (g/L)	
2.2.1 EDTA sódico	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	4,36
2.2.2 Cloruro férrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15
<i>Tomar 1 mL de cada solución primaria (2.1.1 a 2.1.5) + 4,36 g de $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ + 3,15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y llevar a 1 L de agua destilada</i>		
3. Solución de vitaminas	Fórmula química	Concentración final (g/100mL)
3.1 Soluciones primarias		
3.1.1 Biotina cristalizada	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	0,1
3.1.2 Cianocobalamina (B12)	$\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}$	0,1
<i>Tomar 0,1 g de $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ + 0,1 $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}$ y llevar a 100 mL de agua destilada</i>		
3.2 Soluciones secundarias		
3.2 Tiamina clorhídrica	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$	2
<i>Tomar 2 mL de solución 3.1 + 0,2 g de $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$ y llevarlos a 1 L de agua destilada</i>		
Preparación del medio de cultivo		
<i>Para preparar 1L de medio, se mezcla 1 L de agua de mar microfiltrada, con 2 mL de las soluciones 1. y 2.2. Luego de esterilizar por 15 min a 15 psi, se añaden 2 mL de la solución 3.2.</i>		

Tabla A2. Composición y preparación del medio de cultivo MMS medio mínimo de sales

Componente	Fórmula química	Concentración final (g/L)
Fosfato dihidrogeno de potasio	KH_2PO_4	0,5
Cloruro de amonio	NH_4Cl	1
Sulfato de sodio anhidro	Na_2SO_4	2
Nitrato de potasio	KNO_3	2
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
Sulfato de hierro	FeSO_4	0,0004

B. Anexo: Caracterización microscópica

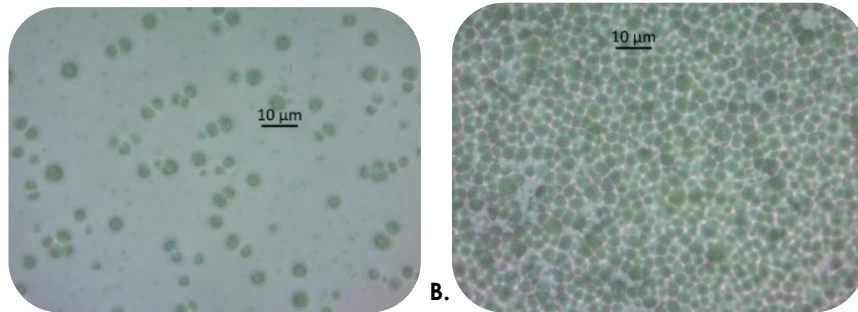


Figura B1. Células cocoidales de la microalga 69060 vistas en microscopio óptico con objetivo 100x fijadas con A.) F/2 y B.) solución Transeau.

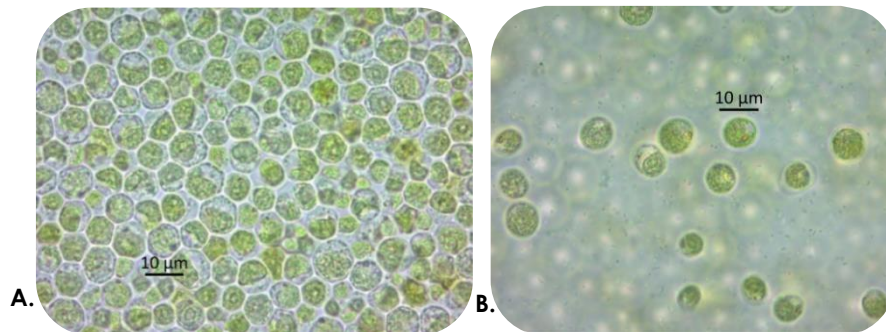


Figura B2. Células de la microalga 69057 vistas en microscopio óptico con objetivo 100x fijadas con A.) solución Transeau y B.) lugol

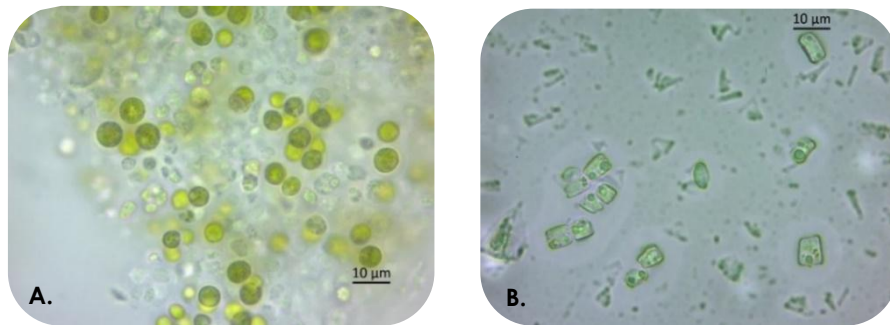


Figura B3. Células de la microalga A. 69055 y B. 69053 vistas en microscopio óptico con objetivo 100x fijadas en F/2 + S.

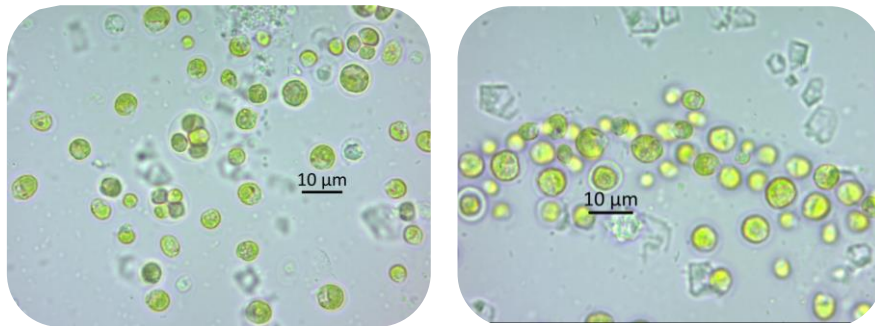


Figura B4. Células de la microalga 69059 vistas en microscopio óptico con objetivo 100x fijadas en F/2

C. Anexo: Bioensayos de tolerancia a petróleo al 1%



Figura C1. Tratamientos de exposición a crudo aceitoso al 1 % de la microalga 69060 a los 30 días, en los que se evidencia la formación de flóculo.

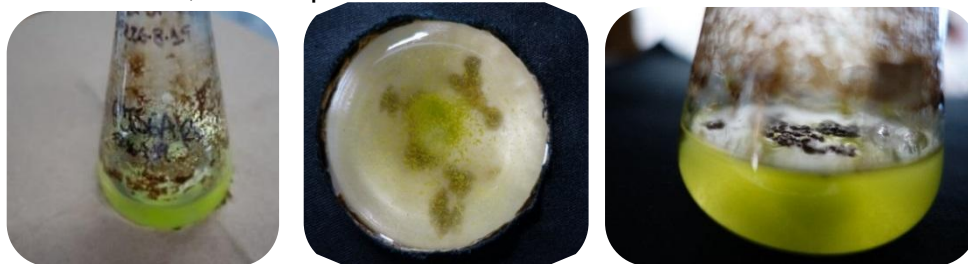


Figura C2. Tratamientos de exposición a crudo aceitoso al 1 % de la microalga 69055 a los 18 días, en los que se evidencia la formación de flóculo.

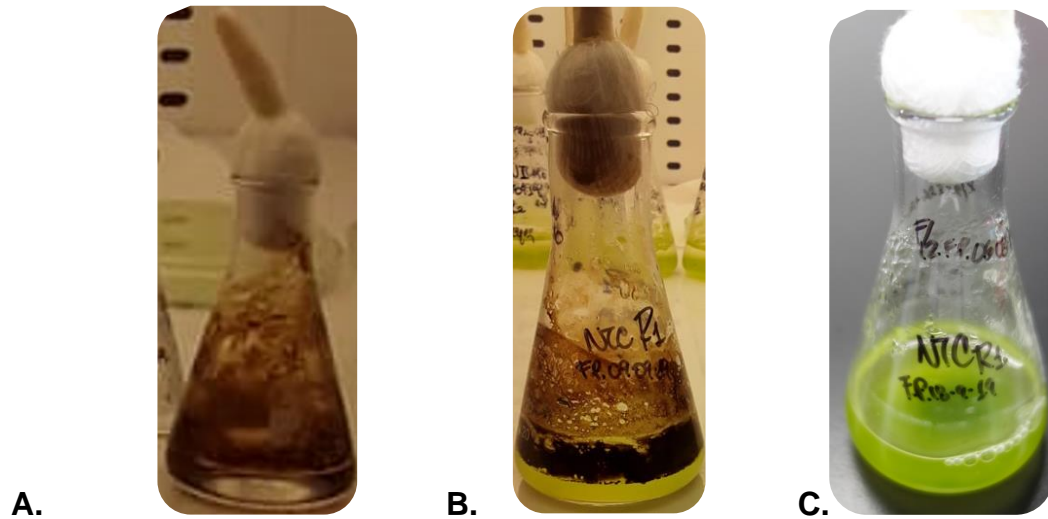


Figura C3. Tratamiento de exposición de la microalga 69061. **A.** Control negativo **B.** tratamiento de la microalga 69061 **C.** Control positivo, crecimiento en F/2.



Figura C4. Final del tratamiento de exposición a crudo aceitoso de la microalga 60055 después de 1 mes de exposición se puede observar que los flóculos detectados en la Figura C2 se deshicieron.

