

|   |  |                             |                  |            |
|---|--|-----------------------------|------------------|------------|
|  | GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS |                             | CÓDIGO           | FO-GS-15   |
|   | ESQUEMA HOJA DE RESUMEN                          |                             | VERSIÓN          | 02         |
|   |  |                             | FECHA            | 03/04/2017 |
|   |  |                             | PÁGINA           | 1 de 1     |
| ELABORÓ   |  | REVISÓ                      | APROBÓ           |            |
| Jefe División de Biblioteca   |  | Equipo Operativo de Calidad | Líder de Calidad |            |

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): KAREN ANDREA APELLIDOS: MONCADA JACOME

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR: Biol, PhD. ANDRÉS FERNANDO APELLIDOS: BARAJAS SOLANO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES PARA LA PRODUCCIÓN DE EPS Y FITOHORMONAS

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos capaces de producir una amplia gama de compuestos bioactivos como pigmentos, vitaminas, proteínas, lípidos, exopolisacáridos y fitohormonas, que han traído el interés industrial debido a sus numerosas aplicaciones en campos como el alimentario, farmacéutico, cosmético, bioenergético, entre otros. Sin embargo, la síntesis de dichos compuestos puede ser afectada de manera directa por las condiciones y parámetros de su cultivo. En consecuencia, esta investigación se enfocó en la determinación de cianobacterias termotolerantes con mayor capacidad de producción de EPS y fitohormonas, y posteriormente en el impacto de los parámetros de cultivo que caracterizan la luz (intensidad lumínica, ciclo de luz/oscuridad y tipo de luz) en la producción de estos compuestos. Se encontró que la cepa con mayor potencial para la producción tanto de fitohormonas como de exopolisacáridos correspondía al género *Hapalosiphon* sp. La cianobacteria fue sometida a las diferentes modificaciones en su cultivo donde se evidencio que la luz roja: azul en una relación de 5:1, una intensidad lumínica aproximada de 40  $\mu\text{mol}$  y un tiempo de exposición a la luz 8 h propiciaron las condiciones más favorables para una mayor producción tanto de EPS como de fitohormonas.

PALABRAS CLAVES: Cianobacteria, exopolisacáridos, fitohormonas, Luz.

PÁGINAS: 67 PLANOS: \_\_\_ ILUSTRACIONES: \_\_\_ CD ROOM: \_\_\_

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES PARA  
LA PRODUCCIÓN DE EPS Y FITOHORMONAS

KAREN ANDREA MONCADA JACOME

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

CÚCUTA

2022

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES PARA  
LA PRODUCCIÓN DE EPS Y FITOHORMONAS

KAREN ANDREA MONCADA JACOME

Proyecto de investigación presentado como requisito para optar el título de

INGENIERO BIOTECNOLÓGICO

Director:

*Biol, Ph.D.* ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

CÚCUTA

2022

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

**FECHA:** 24 noviembre de 2022

**HORA:** 04:00 P.M.

**LUGAR:** AULA SUR – UFPS - CUCUTA, NORTE DE SANTANDER

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** “EVALUACION DEL POTENCIAL DE CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES PARA LA PRODUCCION DE EPS Y FITOHORMONAS”

**MODALIDAD:** INVESTIGACION

**JURADO** EDWIN JAVIER DUARTE GÓMEZ  
PAOLA ANDREA ROMÁN HERNÁNDEZ  
RENZO JOSE PARADA SOLANO

**ENTIDAD:** UFPS

**DIRECTOR:** Biol, Ph.D ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO

| <b>NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE</b> | <b>CODIGO</b> | <b>CALIFICACION</b> |
|---------------------------------|---------------|---------------------|
| Karen Andrea Moncada Jacome     | 1611405       | 5.0                 |

**OBSERVACIONES:** LAUREADO.

**FIRMA DE LOS JURADOS**

Edwin Javier Duarte G

Paola Andrea Román H.

RS

**Edwin Javier Duarte Gómez**

**Paola Andrea Román Hernández**

**Renso Jose Parada Solano**

Renzo Parada Solano

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular** \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco principalmente a Dios por la oportunidad que me dio de iniciar esta carrera profesional, por brindarme la sabiduría, el entendimiento y todas las capacidades para culminar de la mejor manera.

Quiero agradecer y dedicar este logro profesional a mis padres Saide María Jácome Lemus y Francisco Moncada Villamizar y a mi hermano Emanuel Moncada Jácome, quienes confiaron en mí y me apoyaron a lo largo de este proceso, su cariño y consejos fueron mi motivación para alcanzar este logro.

Así mismo agradezco a mi director Andrés Fernando Barajas Solano por darme la oportunidad de trabajar con él, por compartir sus conocimientos y enseñarme de la mejor manera, su dirección y guía me permitieron lograr este último esfuerzo.

Finalmente, agradezco a cada uno de mis compañeros, quienes me brindaron una experiencia maravillosa, por su compañía en los buenos y malos momentos, y por los cuales también fue posible cada pequeño logro.

## Tabla de contenido

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| Introducción                   | 13 |
| 1. El problema                 | 16 |
| 1.1 El título                  | 16 |
| 1.2 Planteamiento del problema | 16 |
| 1.3 Formulación del problema   | 20 |
| 1.4 Justificación              | 20 |
| 1.5 Objetivos                  | 22 |
| 1.5.1 Objetivo general         | 22 |
| 1.5.2 Objetivos específicos    | 22 |
| 1.6 Alcances y limitaciones    | 22 |
| 1.6.1 Alcances                 | 22 |
| 1.6.2 Limitaciones             | 23 |
| 1.7 Delimitaciones             | 23 |
| 1.7.1 Delimitación espacial    | 23 |
| 1.7.2 Delimitación temporal    | 24 |
| 2. Marco referencial           | 25 |
| 2.1 Antecedentes               | 25 |
| 2.2 Marco teórico              | 27 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.2.1 | Generalidades de las cianobacterias   | 28 |
| 2.2.2 | Compuestos producidos a partir de cianobacterias  | 29 |
| 2.2.3 | Exopolisacáridos de microalgas  | 30 |
| 2.2.4 | Fitohormonas  | 31 |
| 2.2.5 | Importancia de la luz en el cultivo de las microalgas   | 32 |
| 2.3   | Marco conceptual  | 34 |
| 2.4   | Marco contextual  | 35 |
| 2.5   | Marco legal   | 35 |
| 3.    | Diseño metodológico   | 37 |
| 3.1   | Tipo de investigación   | 37 |
| 3.2   | Población y muestra   | 37 |
| 3.3   | Hipótesis   | 37 |
| 3.4   | Variables   | 38 |
| 3.4.1 | Variables dependientes  | 38 |
| 3.4.2 | Variables independientes  | 38 |
| 3.5   | Fases de la investigación   | 38 |
| 4.    | Resultados y análisis   | 43 |
| 4.1   | Selección de cepas de cianobacterias termotolerantes con mayor capacidad de producción de Exopolisacáridos (EPS) y fitohormonas | 43 |
| 4.2   | Determinación del efecto de la calidad de la luz, ciclo de luz e intensidad en la producción de EPS y fitohormonas              | 46 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| Conclusiones               | 59 |
| Recomendaciones            | 60 |
| Referencias bibliográficas | 61 |

## Lista de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Medio BG11   | 39 |
| <b>Tabla 2.</b> Diseño óptimo tipo personalizado para determinar el efecto de la luz.  | 41 |
| <b>Tabla 3.</b> ANOVA de EPS   | 48 |
| <b>Tabla 4.</b> ANOVA de IAAs.   | 51 |
| <b>Tabla 5.</b> Condiciones de comprobación.   | 53 |
| <b>Tabla 6.</b> Comparación de las concentraciones de exopolisacáridos y fitohormonas en microalgas y cianobacterias bajo diferentes condiciones de luz. | 55 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Máximos de absorción de pigmentos: clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas (ficocianina y ficoeritrina).                       | 34 |
| <b>Figura 2.</b> Cultivo de cepas termotolerantes en medio BG11.   | 43 |
| <b>Figura 3.</b> Producción de Fitohormonas y exopolisacáridos de cepas termotolerantes.   | 44 |
| <b>Figura 4.</b> Cultivo de <i>Hapalosiphon</i> sp empleando luz blanca (a), luz roja/azul 1:3 (b), luz roja: azul 4:1 (c) y luz roja: azul 5:1 (d). | 47 |
| <b>Figura 5.</b> Superficie de respuesta para la producción de EPS.  | 49 |
| <b>Figura 6.</b> Superficie de respuesta para la producción de Fitohormonas.   | 52 |
| <b>Figura 7.</b> Cultivo de <i>Hapalosiphon</i> sp empleando luz roja/azul 5:1 (E1 Y E2) y luz blanca (E2).  | 54 |
| <b>Figura 8.</b> Análisis experimental para las tres condiciones.  | 54 |

## Resumen

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos capaces de producir una amplia gama de compuestos bioactivos como pigmentos, vitaminas, proteínas, lípidos, exopolisacáridos y fitohormonas, que han traído el interés industrial debido a sus numerosas aplicaciones en campos como el alimentario, farmacéutico, cosmético, bioenergético, entre otros. Sin embargo, la síntesis de dichos compuestos puede ser afectada de manera directa por las condiciones y parámetros de su cultivo. En consecuencia, esta investigación se enfocó en la determinación de cianobacterias termotolerantes con mayor capacidad de producción de EPS y fitohormonas, y posteriormente en el impacto de los parámetros de cultivo que caracterizan la luz (intensidad lumínica, ciclo de luz/oscuridad y tipo de luz) en la producción de estos compuestos. Se encontró que la cepa con mayor potencial para la producción tanto de fitohormonas como de exopolisacáridos correspondía al género *Hapalosiphon* sp. La cianobacteria fue sometida a las diferentes modificaciones en su cultivo donde se evidenció que la luz roja: azul en una relación de 5:1, una intensidad lumínica aproximada de 40  $\mu\text{mol}$  y un tiempo de exposición a la luz 8 h propiciaron las condiciones más favorables para una mayor producción tanto de EPS como de fitohormonas. En este sentido, los hallazgos encontrados en este estudio contribuyen a una mejora en los parámetros de cultivo para una producción eficiente y sustentable de dichos metabolitos, así como un punto de partida para posteriores investigaciones.

**Palabras clave:** Cianobacteria, exopolisacáridos, fitohormonas, Luz.

## **Abstrac**

Microalgae and cyanobacteria are photosynthetic microorganisms capable of producing a wide range of bioactive compounds such as pigments, vitamins, proteins, lipids, exopolysaccharides and phytohormones, which have brought industrial interest due to their numerous applications in fields such as food, pharmaceuticals, cosmetics, bioenergy, among others. However, the synthesis of these compounds can be directly affected by the conditions and parameters of their cultivation. Consequently, this research focused on the determination of thermotolerant cyanobacteria with higher production capacity of EPS and phytohormones, and subsequently on the impact of cultivation parameters that characterize light (light intensity, light/dark cycle and type of light) on the production of these compounds. It was found that the strain with the greatest potential for the production of both phytohormones and exopolysaccharides corresponded to the genus *Hapalosiphon* sp. The cyanobacterium was subjected to different modifications in its culture where it was shown that the red: blue light in a ratio of 5:1, a light intensity of approximately 40  $\mu\text{mol}$  and a light exposure time of 8 h provided the most favorable conditions for a greater production of both EPS and phytohormones. In this sense, the findings of this study contribute to an improvement in the cultivation parameters for an efficient and sustainable production of these metabolites, as well as a starting point for further research.

**Key words:** Cyanobacteria, exopolysaccharides, phytohormones, light.

## Introducción

La biotecnología de las microalgas y cianobacterias ha adquirido gran relevancia en los últimos años debido a las numerosas aplicaciones de este grupo de microorganismos en sectores como el alimentario, ambiental, cosmético, industrial y farmacéutico.

Las cianobacterias se han reportado como organismos útiles para la fertilidad del suelo y la producción de cultivos, dada su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfatos y generar reguladores de crecimiento en las plantas (Toribio et al., 2020). Así mismo, se han implementado como suplemento alimenticio humano y animal con producción de biomasa de alto contenido proteico y en el tratamiento de aguas residuales industriales y domésticas dada su capacidad para eliminar o retener amoníaco, fosfatos y otros iones de metales pesados (Garlapati et al., 2019). Adicionalmente, las cianobacterias han recibido una notable atención al generar una gran variedad de sustancias químicas que exhiben potentes actividades antimicrobianas útiles con finalidades terapéuticas (Abdo et al., 2021; Sahieb et al., 2014; Singh et al., 2019). Estos microorganismos presentan una mayor eficacia fotosintética, así como una tasa de crecimiento específica en comparación con los cultivos terrestres, de modo que son considerados fuente de materia prima potencial para la producción de biocombustibles de tercera generación con numerosas ventajas (Chen et al., 2011; Tiwari et al., 2019). A su vez, diversas cepas de cianobacterias pueden inducir del mismo modo la producción de compuestos de gran interés y valor económico; tales como fitohormonas, aminoácidos, polisacáridos, vitaminas, enzimas y otros metabolitos biológicamente activos, que juegan un papel fundamental en la fisiología de plantas y en la proliferación de

sociedades microbianas en el suelo (Renuka, 2018; López et al., 2020) y que representan una plataforma atractiva como fuente de sustancias con gran potencial biotecnológico.

Las cianobacterias excretan exocelularmente revestimientos externos que reciben el nombre de exopolisacáridos (EPS). Estas macromoléculas constituyen una propiedad común de las biopelículas microbianas, donde cumplen funciones protectoras y estructuras clave (Rossi & De Philippis, 2015; Parwani et al., 2021), desempeñando un rol importante en la adaptación ambiental por lo que han recibido gran atención y perspectivas de aplicación (Qian et al., 2020). Los EPS de las cianobacterias son heteropolisacáridos únicos y, al ser de naturaleza aniónica, poseen la capacidad de retención de iones de metales pesados (Potnis et al., 2021), ayudando a mantener la estabilidad de los agregados del suelo y aumentando así el desarrollo de las plantas en suelos salinos o contaminados (Adessi et al., 2018; Santini et al., 2021). Así mismo, son aplicados en áreas como la biomedicina para el transporte y entrega de proteínas o vitaminas (Estevinho et al., 2019; Leite et al., 2017; Mota et al., 2018), como un recubrimiento antiadherente (Costa et al., 2019; Mota et al., 2020) y como portadores de células en la ingeniería de tejidos (Marković et al., 2016; Singh et al., 2019). En la industria alimentaria y cosmética son útiles como floculantes, espesantes, hidratantes, emulsionantes y/o gelificantes (Mota et al., 2020) gracias a sus propiedades reológicas y antioxidantes (Tiwari et al., 2019).

Las cianobacterias también realizan un papel fundamental en el suministro de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas) (Toribio et al., 2020), las cuales se han descrito como sustancias importantes en el crecimiento y desarrollo de la planta. Estas sustancias funcionan como moléculas de señalización en distintas funciones de la planta. Entre estas fitohormonas, el ácido indol-3 acético

(IAA), el derivado más importante del grupo de las auxinas y otros grupos de auxinas producen diferentes efectos, como la inducción de la elongación y la división celular, mejorando el desarrollo la planta (Li et al., 2017; Duong et al., 2021). Las citoquininas, por ejemplo, están relacionadas con la activación de las funciones de división celular, organogénesis y senescencia tardía de las plantas, mientras que el ácido salicílico por su parte, está asociado con la activación de la respuesta defensiva de la planta (Toribio et al., 2020). Las fitohormonas también regulan diversas actividades enzimáticas y cambios metabólicos que se producen durante el crecimiento de la planta (Mohan & Kumar, 2019).

No obstante, el rendimiento de los EPS y las fitohormonas a escala industrial es limitado. Chamizo et al. (2020) señala que, la síntesis de EPS por una cepa de cianobacterias definida es dependiente primordialmente de la especie y las condiciones de cultivo, como la fuente de nitrógeno, luz, temperatura, salinidad y el contenido de fósforo y potasio (De Philippis & Vincenzini, 1998; Nicolaus et al., 1999; Otero & Vincenzini, 2003). Se ha demostrado que en cianobacterias como *Nostoc* sp. y *Microcoleus vaginatus* la producción de EPS incrementa con la intensidad de la luz (Ge et al., 2014; Singh et al., 2019). De igual manera, en la cianobacteria *Nostoc flagelliforme* se observó una estimulación en la producción de polisacáridos por efecto de la luz roja (Han et al., 2015; Chamizo et al., 2020). En este sentido, el uso de condiciones controladas de cultivo junto con la plasticidad y el metabolismo de las cianobacterias suponen un conjunto de posibilidades para mejorar la calidad y el contenido de estos compuestos (Santini et al., 2021). De ahí la importancia de establecer posteriores investigaciones que esclarezcan el efecto de los diferentes factores y de esta manera poder explotar óptimamente su potencial a escala industrial.

## **1. El problema**

### **1.1 El título**

Evaluación del potencial de cianobacterias termotolerantes para la producción de EPS y fitohormonas

### **1.2 Planteamiento del problema**

Las microalgas y cianobacterias representan el primer eslabón en la cadena alimenticia, en el que se hallan microorganismos de enorme trascendencia económica debido a su importante papel en la obtención de numerosas sustancias con potencial biotecnológico. Se trata de microorganismos acuáticos capaces de captar la energía lumínica del sol para realizar la fotosíntesis. Esta energía solar es absorbida por medio de pigmentos fotosintéticos y carotenoides, y de esta forma producen metabolitos desde compuestos sencillos como el dióxido de carbono, sales inorgánicas y metales solubles en el agua de océano (Treece & Yates, 1993; Romeral et al., 2017). Revisiones actuales informan relevantes adelantos en la investigación sobre el potencial de las microalgas para generar carotenoides, lípidos, ácidos grasos valiosos y las posibilidades y perspectivas de la ingeniería metabólica para incrementar su producción (Wan et al., 2021; Vecchi et al., 2020; Maltsev et al., 2021).

El cultivo de microalgas para la obtención de biomasa o como procedimiento de producción de metabolitos de interés, es dependiente de varios componentes entre los que se hallan el medio de cultivo, la luz, el pH, la temperatura y la agitación (Álvarez, 2018). Dichos componentes ambientales no solo afectan el proceso fotosintético y la productividad de la biomasa celular sino también al patrón, la ruta y la actividad del metabolismo celular y la composición celular de forma dinámica (Romeral et al., 2017).

La disponibilidad de nutrientes y la luz son las variables primordiales que influyen en la fisiología de las microalgas. A medida que los nutrientes son necesarios para la síntesis de biomasa, la intensidad y calidad de luz establece la proporción de energía disponible para ocupaciones metabólicas (Vásquez et al., 2013; Guevara et al., 2016) Sin embargo, el crecimiento de las microalgas también puede verse afectado no solo por la intensidad de la luz, sino que también depende de los ciclos luz y oscuridad (fotoperiodos) a los que son sometidos los cultivos, y a la coloración de la luz incidente (longitud de onda). No obstante, la influencia de estos factores sobre el desarrollo de las microalgas y la fabricación de productos de interés, dependen tanto de la especie microalgal como de la cepa en análisis (Romeral et al., 2017).

Diversos estudios informan que la intensidad de luz y la longitud de onda desempeñan un papel crítico en la actividad fotosintética, lo que es consecuentemente reflejado en su crecimiento, puesto que, los fotosistemas catalizan la reacción de transformación de la energía lumínica, capturada por las moléculas excitadas de la clorofila a modo de energía utilizable (Cheirsilp & Torpee, 2012; Vásquez-Villalobos et al., 2017). Si bien una baja iluminación puede provocar un impacto limitante sobre el crecimiento de las microalgas, una iluminación bastante alta puede

provocar un impacto inhibitorio (Airs et al, 2014; Wong et al., 2016; Raqiba & Sibi, 2019). Erickson et al. (2016) afirma que la exposición de las microalgas bajo una luz desmesurada puede ocasionar afectaciones fotooxidativas en el aparato fotosintético y reducir la eficiencia y la rapidez de la fotosíntesis, es decir, la fotoinhibición (Maltsev et al., 2021). Según Martínez (2008) los cultivos microalgales exteriores suelen padecer fotoinhibición en las principales horas del día a causa de la alta intensidad lumínica (Ramos & Pizarro, 2018). Entre los problemas causados por la fotoinhibición se reportan resultados nocivos para la misma célula e inclusive su deceso, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Contreras-Flores et al., 2003; Richmond, 2004; Martínez, 2008; Park et al., 2011; Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Ramos & Pizarro, 2018).

La duración de la iluminación, de igual manera, corresponde a un aspecto de esencial importancia, tanto para garantizar la máxima productividad de las microalgas, como para reducir los costes energéticos a lo largo del cultivo. Se ha reportado que la iluminación continua puede comenzar procesos de fotoinhibición, mientras tanto que la utilización de períodos oscuros, incluidos los de corta duración, puede contribuir a restablecer las afectaciones en los fotosistemas (Yustinadiar et al, 2020; Maltsev et al, 2021). De acuerdo con Vásquez-Villalobos et al. (2017) el fotoperiodo tiene impacto sobre los ciclos de vida y ocupaciones metabólicas de las microalgas. Según un estudio realizado por Rodríguez y Triana (2006) sostienen que la *Spirulina* no puede tolerar una exposición prolongada de iluminación, debido a que puede ser acabado por fotólisis, recomendando la necesidad de conservar la iluminación controlada en fotoperiodos regulados de tiempo 12/12 horas (día/noche) (Vásquez-Villalobos et al., 2017). En *Nostoc calciola* una intensidad lumínica de  $21 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de 8:16 luz: oscuridad provoca la

acumulación de proteínas y ficobiliproteínas, mientras que, a una intensidad lumínica de  $63 \mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una iluminación más prolongada (16:8 luz: oscuridad) ocasiona una acumulación de carbohidratos y carotenoides (Khajepour et al., 2015; Maltsev et al., 2021). Existen estudios sobre el cultivo de microalgas bajo luz continua que han demostrado que se alcanza la máxima tasa de crecimiento registrada. Pero en realidad, los ciclos de luz y oscuridad son necesarios, debido a que la fotosíntesis se rige por 2 etapas: una etapa fotoquímica que depende de la luz, y otra, una etapa oscura bioquímica que es libre de la luz. Los compuestos que se generan en la etapa dependiente de la luz se utilizan en la etapa oscura para sintetizar moléculas metabólicas fundamentales para el crecimiento (Álvarez, 2018).

En la actualidad, diversos estudios se han desarrollado para mejorar la eficiencia de implementación de la luz y minimizar los precios de sistemas de iluminación artificial. Cultivos de laboratorio emplean tubos fluorescentes, los que consumen alta energía comparada con los diodos emisores de luz LED's (Light Emitting Diodes), cuyo tiempo de vida e intensidad ( $\text{W}/\text{m}^2$ ) son 941% y 500% más respectivamente (Carvalho et al., 2011). Algunos cultivos usan únicamente energía solar como fuente de luz. No obstante, el rendimiento de los sistemas al aire libre, es más inferior que los llevados a cabo en lugares cerrados (Chen et al., 2011; Vásquez-Villalobos, 2017). Por consiguiente, la intensidad de luz en los sistemas con luz artificial tiene que proporcionarse con cuidado, evitando el fenómeno de fotooxidación o fotoinhibición los cuales generan perjuicios en el aparato fotosintético de la célula (Pedrosa-Bezerra et al., 2012; Vásquez-Villalobos et al., 2017).

En este sentido, la investigación sobre la producción de fitohormonas y exopolisacáridos en cepas de cianobacterias termotolerantes expuestas a variaciones de los parámetros de cultivo como

tipo de luz, intensidad y ciclo de luz y oscuridad (fotoperiodo) permitirá la generación de nuevos conocimientos que orienten a la comprensión adecuada de un óptimo crecimiento microalgal que a su vez permita la obtención de productos de alto valor agregado con una reducción de costos y tiempo de proceso.

### **1.3 Formulación del problema**

¿Cuáles serían las condiciones óptimas del ciclo luz/oscuridad, intensidad lumínica y tipo de luz en la producción eficiente de fitohormonas y Exopolisacáridos (EPS) en cianobacterias termotolerantes?

### **1.4 Justificación**

Recientemente se ha estudiado el uso de las microalgas como fuente de materia prima prometedora para la producción sustentable de biocombustibles y muchos otros productos primarios. No obstante, la mejora de su productividad por medio de la evaluación del efecto que poseen diversos componentes del medio ambiente en el crecimiento de microalgas todavía necesita una profunda indagación, así como varios experimentos que exigen un largo tiempo (Perin et al., 2016).

El crecimiento de microalgas está definido por la acción de varios factores, sin embargo, a partir de la perspectiva de la aplicación del crecimiento autótrofo, la luz es de fundamental

trascendencia. Establece el estado funcional, desarrollo y reproducción de microalgas y plantas fotoautótrofas, y además tiene un impacto directo sobre el metabolismo tanto de microalgas mixotróficas, capaces de combinar tipos de nutrición autótrofos y heterótrofos, como fotoheterótrofos (Zhang et al., 2016; Primer et al., 2018; Abiusi et al., 2020; Maltsev et al., 2021). Las manipulaciones en los parámetros de cultivo asociados a la luz (intensidad de la luz, la composición espectral, la duración y la frecuencia de iluminación) tienen la posibilidad de actuar como un instrumento eficaz para regular el crecimiento de las microalgas, los cambios en el metabolismo y la inducción de compuestos importantes a partir de un punto de vista bioquímico (Maltsev et al., 2021).

En la actualidad, las tecnologías de microescala permanecen emergiendo como una herramienta importante para mejorar la producción de datos y por consiguiente agilizar el proceso de optimización o mejora, conservando una alta fiabilidad experimental. La utilización de dichos enfoques para el cultivo microalgal muestra retos extras gracias a la necesidad de intentar con la luz como fuente de energía para ayudar el metabolismo celular (Perin et al., 2016).

En este sentido, la investigación sobre el impacto de los parámetros que caracterizan las condiciones de luz y su relación con la producción de productos y metabolitos de interés es de suma importancia en la determinación de las condiciones óptimas de cultivo de microalgas que permitan un incremento en la productividad al aumentar la eficiencia de absorción lumínica y que a su vez reduzca el consumo de energía, permitiendo crear así una plataforma sustentable de productos y sustancias con potencial biotecnológico que cumplan con los requisitos de viabilidad comercial y satisfagan las necesidades del mercado actual.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

Determinar las cepas de cianobacterias termotolerantes con mayor capacidad de producción de fitohormonas y Exopolisacáridos (EPS)

### **1.5.2 Objetivos específicos**

✓ Identificar el efecto de la calidad de la luz y su intensidad en la producción de fitohormonas y Exopolisacáridos (EPS)

✓ Evaluar el efecto del ciclo de luz/oscuridad en la producción de fitohormonas y Exopolisacáridos (EPS)

## **1.6 Alcances y limitaciones**

### **1.6.1 Alcances**

Con este trabajo se pretende establecer cuáles son las cepas de cianobacterias con mayor capacidad de producción de fitohormonas y exopolisacáridos y si esta capacidad puede mejorar con

el control de las condiciones lumínicas sobre el medio de cultivo. Se espera que este proyecto aporte en la determinación de las condiciones óptimas de luz que permitan aumentar la eficiencia del cultivo en la obtención de los metabolitos de interés, al mismo tiempo que minimiza los costos energéticos y de producción.

## **1.6.2 Limitaciones**

Entre los principales inconvenientes que se pueden presentar a lo largo del proyecto se encuentran los daños o pérdidas del material microbiano, reactivos o materia prima y equipos presentes en el laboratorio, así como también posibles perjuicios a la salud como caídas, cortes quemaduras térmicas o químicas e inhalación de productos químicos. La contaminación en los cultivos microbianos y problemas en el montaje de los experimentos son otras de las posibles causas que pueden afectar la obtención de los resultados esperados, al mismo tiempo que producen retrasos en el desarrollo del proyecto. Así mismo, la demora en la compra de los reactivos y herramientas que se necesitan para la realización de la investigación y su alto costo económico pueden generar contratiempos en el desarrollo normal de las actividades.

## **1.7 Delimitaciones**

### **1.7.1 Delimitación espacial**

Este proyecto se ejecutará en el Laboratorio de Investigación INNOValgæ, de la Universidad Francisco De Paula Santander, Sede Campos Elíseos.

### **1.7.2 Delimitación temporal**

El presente trabajo de investigación se desarrollará en un tiempo aproximado de 8 meses después de su aprobación.

## 2. Marco referencial

### 2.1 Antecedentes

Muchos sectores como el farmacéutico, alimenticio, cosmético, industrias de embalaje, los textiles, los detergentes, los adhesivos, la agricultura, el tratamiento de aguas residuales y la nanotecnología se han favorecido del uso de los EPS. A escala internacional en las industrias farmacéuticas, los EPS cianobacteriales se han empleado extensamente por sus propiedades antivirales, antitumorales, antibacterianas, cicatrizantes, antifúngicas, antioxidantes, inmunomoduladoras, anticoagulantes, entre otras (Cumberland & Lead, 2013; (Escárcega-González et al., 2018). Bhatnagar et al., (2014) informaron sobre la propiedad antibacteriana de EPS extraídos de cuatro cianobacterias de un desierto en la India, *Tolypothrix tenuis*, y tres especies tres especies de *Aanabaena*, frente a importantes agentes infecciosos de heridas, incluidos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580). Dichos polímeros, además, se caracterizaron por su actividad antirradicalaria, quelante de  $Fe^{2+}$  y actividades antioxidantes contra  $O_2\cdot$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  y  $NO\cdot$  (Parwani et al., 2021). De la misma forma, Fukushima et al., (2016) en su trabajo denominado “Clinical Evaluation of Novel Natural Polysaccharides Sacran as a Skincare Material for Atopic Dermatitis Patients” de la Universidad de Kumamoto, Kumamoto, Japón, obtuvieron películas e hidrogeles formados por el polisacárido sacran, extraído de *Aphanothece sacrum*, con la capacidad de actuar como agente antiinflamatorio contra el edema cutáneo, o para el tratamiento de la dermatitis atópica.

Por otra parte, los EPS también se han destinado como una alternativa en la biorremediación de metales pesados, Mota et al., (2016) realizaron un estudio empleando la cianobacteria unicelular *Cyanothece* sp. CCY 0110 en la biorremediación de tres contaminantes más comunes en cuerpos de agua (cobre, cadmio y plomo) en Porto, Portugal. El estudio demostró que los polisacáridos liberados (RPS) fueron la fracción más eficiente eliminando los metales por bioabsorción.

Ahora bien, es manifiesto que el crecimiento y la composición de las microalgas está sujeta a la disponibilidad de nutrientes en el medio, la disposición de la energía radiante dentro del cultivo y a las tensiones ambientales (Vonshak & Tomaselli, 2000; Zapata et al., 2021). Existen estudios comparativos sobre los efectos de la calidad de la luz en la producción de polisacáridos. Han et al., (2015) en la investigación “Comparative metabolomic analysis of the effects of light quality on polysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*” realizada en Tianjin, China, refirieron que en la cianobacteria *Nostoc flagelliforme* la influencia de la luz roja en el metabolismo celular y la producción de polisacáridos era bastante significativa respecto a otros tipos de luz, ya que la luz roja inducía la fotoinhibición y, por lo tanto, estimulaba la producción de polisacáridos. Por el contrario, Medina -Cabrera et al., (2020) mediante un trabajo realizado en Alemania, estudiaron el crecimiento y la producción de exopolisacáridos de *Porphyridium sordidum* y *Porphyridium purpureum*, mediante la influencia de la luz a diferentes longitudes de onda y la variación de los nutrientes, así como de los factores abióticos, encontrándose el efecto de la luz blanca como es el más adecuado para ambas cepas en cuanto al crecimiento y producción de EPS.

Entre otros compuestos importantes obtenidos por las microalgas y cianobacterias, y que se encuentran regulados por la influencia de la luz, las fitohormonas han adquirido reciente atención

por su potencial aplicación en la agricultura como biofertilizantes y bioestimulantes, resultando una opción ambientalmente sostenible para promover el crecimiento y el rendimiento de plantas. Wenz, Davis, & Storteboom. (2019) de la Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, Colorado, EE. UU, en su trabajo “Influence of light on endogenous phytohormone concentrations of a nitrogen-fixing *Anabaena* sp. cyanobacterium culture in open raceways for use as fertilizer for horticultural crops” indicaron que es posible influir en las concentraciones de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), el ácido indol-3-acético (IAA), y el ácido salicílico (SA), mediante la manipulación de la disponibilidad de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), durante la producción por lotes.

Aunque existen reportes que manifiestan que los cultivos algales sometidos a ciclos de luz y oscuridad poseen concentraciones de ácido indol-3-acético (IAA) más altas que aquellos sometidos en oscuridad continua, sin embargo, algunas cepas de cianobacterias, excretan más IAA en la oscuridad de forma similar a las levaduras y hongos. (Prasanna et al. 2009; Ahmed et al. 2010; Stirk et al. 2014; Tan et al., 2021). Esta cualidad también fue evidenciada en la investigación “Phytohormone production and morphology of *Spirulina platensis* grown in dairy wastewaters” desarrollada en la ciudad de Medellín, Colombia. En ella, Zapata et al., (2021) describieron que la producción de fitohormonas por *Spirulina platensis* empleando como medio de cultivo aguas residuales de la industria láctea, era significativamente mayor bajo circunstancias de baja iluminación ( $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Generalidades de las cianobacterias

Las cianobacterias, comúnmente llamadas algas verde-azules, conforman un interesante conjunto de algas fotoautótrofas y procariotas que prosperan exitosamente en casi todos los hábitats probables y diferentes de la Tierra. Las cianobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en el planeta, prosperando desde zonas templadas hasta las tropicales y áridas. A partir de la perspectiva evolutiva, dichos organismos poseen una historia evolutiva bastante extensa, y se les atribuye haber oxigenado la Tierra debido a la evolución del oxígeno fotosintético (Singh et al., 2019).

Las cianobacterias se consideran un grupo de microorganismos gram-negativos muy diversos, encontrándose en formas que van de unicelulares a pluricelulares, de cocos a filamentos ramificados, de casi incoloras a intensamente pigmentadas, de autótrofas a heterótrofas, de psicrófilas a termófilas, de acidófilas a alcalófilas y de planctónicas a bentónicas/epífitas/epilíticas (Thajuddin & Subramanian 2005; Borah et al., 2018).

Estos microorganismos son capaces de transformar la energía solar en energía química por medio de la fotosíntesis. Además, acumulan numerosos compuestos bioactivos que pueden aprovecharse para uso comercial. El potencial de la fotosíntesis de microalgas para la producción de compuestos importantes o para uso energético es extensamente reconocido debido a su utilización más eficiente de la energía de la luz en comparación con las plantas superiores (Álvarez, 2018).

### 2.2.2 Compuestos producidos a partir de cianobacterias

Con el tiempo, las cianobacterias han evolucionado produciendo una gama de metabolitos secundarios para ajustarse a los diferentes cambios en su entorno a causa de altas temperaturas, pH, fósforo y nitrógenos disueltos (Descy et al., 2016; Dulic et al., 2016; Gademann & Portmann, 2008; Harke et al., 2016; Wood et al., 2017; Haque et al., 2017). Dichos metabolitos secundarios resultan en una variedad de productos útiles con importantes aplicaciones biotecnológicas e industriales por lo que se consideran compuestos de gran interés y valor económico.

Varias especies de cianobacterias inducen metabolitos fotoprotectores, como la escitonemina y los aminoácidos similares a la micosporina (MAA), que desempeñan un papel importante en el cribado de la radiación ultravioleta (Sinha & Häder, 2008). Así mismo, produce varias enzimas como el superóxido dismutasa, la catalasa y las peroxidasas. Ciertas cianobacterias también dan lugar a la generación de quelantes del hierro (sideróforos) como la esquizoquina, la sinecobactina y la anacolina. Entre los metabolitos tóxicos producidos por las cianobacterias se hallan compuestos como la microcistina, la anatoxina y la saxitoxina, que presentan hepatotoxicidad y neurotoxicidad (Karl & Cyril, 2008). Las toxinas de las cianobacterias también muestran propiedades aleloquímicas, y también se han investigado sus aplicaciones como alguicidas, herbicidas e insecticidas (Singh et al., 2019). De igual manera, las cianobacterias pueden sintetizar numerosos metabolitos secundarios complejos, como péptidos, policétidos, alcaloides, exopolisacáridos y fitohormonas, que han atraído a los investigadores por sus explotaciones farmacéuticas y biotecnológicas (Thajuddin y Subramanian 2005; Sielaff et al. 2006; Spolaore et al. 2006; Kumar et al., 2019).

### 2.2.3 Exopolisacáridos de microalgas

Muchas cepas de cianobacterias poseen estructuras polisacáridicas que rodean sus células. Se trata de sustancias poliméricas de alta viscosidad con estructura bioquímica variable y características biofísicas que se hallan en medio de las construcciones bacterianas estructural y funcionalmente más complejas (Hill et al., 1994). Dichos biopolímeros conforman una envoltura que recubre las células llamada vaina, glicocáliz, cápsula o limo, dependiendo de su consistencia y localización (De Philippis y Vincenzini, 1998), que salvaguardan las células de las tensiones físicas y biológicas (Costa et al., 2018; Chamizo, 2020), por lo que su presencia se estima está estrechamente relacionada con la función de dichos organismos para encarar exitosamente diversas condiciones ambientales adversas. Los exopolisacáridos de las microalgas pueden encontrarse asociados a la superficie de la célula (polímeros ligados a la célula) y/o liberarse al medio ambiente circundante (Arad & Ontman, 2010; De Philippis et al., 1998, 2001; Delattre, 2016).

Los polisacáridos han recibido recientemente gran atención gracias a la detección de diferentes actividades biológicas, como las inmunomoduladoras, antibacterianas, anticoagulantes, antimutagénicas, radioprotectoras, antioxidantes, antiulcerosas, anticancerosas y antiinflamatorias (Kraan, 2012; Misurcova et al., 2015; Raposo et al., 2013, 2015). Desempeñan un papel fundamental en las complicadas construcciones comunitarias microbianas de los flóculos y las biopelículas y otorgan reservas de carbono y energía para bastantes tipos de células (Delattre, 2016). Sin embargo, a pesar de su trascendencia fisiológica y ecológica, la síntesis de EPS cianobacterianos todavía es hasta el momento un proceso complejo y mínimamente comprendido, y se dispone de información muy reducida sobre los datos relacionados con el ensamblaje y la excreción de polímeros. Además,

se conoce que la síntesis de EPS se ve afectada por parámetros nutricionales y del medio ambiente a un grado específico de la especie, lo cual provoca que el proceso de producción sea complicado de comprender (Rossi & De Philippis, 2015; Parwani et al., 2021).

#### **2.2.4 Fitohormonas**

Las cianobacterias también representan un papel importante en el suministro de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas) las cuales se han descrito como sustancias importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Toribio et al., 2020). Las fitohormonas aportan en la coordinación de varios procesos fisiológicos en las plantas, incluida la regulación de la quiescencia y la germinación de las semillas, la formación de raíces, la inflorescencia, la ramificación y macollamiento y la maduración del fruto (Miyoshi & Mii, 1995; Koshitaa et al., 1999; McSteen & Leyser, 2005; Saranga & Cameron, 2007; McAtee & Col, 2013). De igual manera, incrementan la resistencia de las plantas a los factores ambientales (Rodríguez et al., 2006; Wally, 2013; Santini et al., 2021) y promueven o suprimen la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Bari & Jones, 2009; Shan et al., 2012). Se ha demostrado que los extractos acuosos e hidrolizados de *A. platensis* presentan cantidades relativamente altas de fitohormonas, como el ácido abscísico, las citoquininas y el ácido jasmónico, relacionados en la respuesta de las plantas a las tensiones abióticas (Bayona et al., 2020; Amin et al., 2009). La producción de ácido abscísico en respuesta al estrés salino también se observó en el medio de cultivo de *Nostoc muscorum* y *Synechococcus leopoliensis* dos horas después de la aplicación de NaCl (Maršálek, 1992; Santini et al., 2021).

### **2.2.5 Importancia de la luz en el cultivo de las microalgas**

El cultivo de microalgas y cianobacterias para la obtención de biomasa o para la producción de metabolitos valiosos, está influenciado por diversos factores, entre los que se encuentran el medio de cultivo, la luz, el pH, la temperatura, la agitación y el sistema de cultivo. Aunque cada uno de ellos son de gran trascendencia, se puede asegurar que la luz es el factor de mayor importancia en el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos, dado que representa la principal fuente de energía, cuando el crecimiento no se ve limitado por la fuente de nutrientes (Álvarez, 2018).

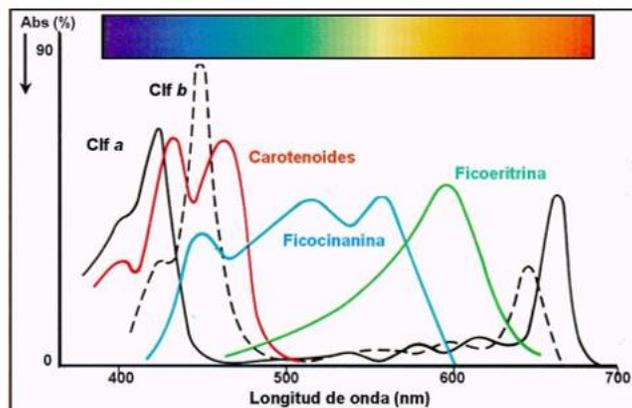
El cultivo de las microalgas puede realizarse bajo condiciones de luz natural y artificial. El cultivo de las microalgas bajo luz natural resulta muy ventajoso, al ser gratuita y encontrarse en gran abundancia (Álvarez, 2018), sin embargo, no es posible controlarla a propósito. Los sistemas de cultivo cerrados, fotobiorreactores, donde se aplica iluminación artificial, tienen la posibilidad de manejar y modificar las condiciones de iluminación, una característica útil comúnmente usada en la búsqueda del incremento de la productividad de la biomasa y la acumulación de compuestos valiosos (Maltsev et al., 2021).

El tiempo de exposición a la luz y oscuridad tiene un efecto significativo sobre los ciclos de vida y los procesos metabólicos de las microalgas, bien sea en cultivos artificiales como en los naturales (Humprey, 1979). Se ha observado su influencia en procesos como la fijación de nitrógeno, fotosíntesis y división celular (Mittag, 2001). Generalmente, se estima que las algas muestran una tasa de incremento que es proporcional a la duración del lapso de luz efectiva. Además del contenido de los pigmentos, otros elementos celulares como ácidos grasos insaturados, carbohidratos y

proteínas pueden modificarse debido al régimen de luz (Renaud et al., 1991; Álvarez, 2018). Por lo tanto, una preocupación urgente en el cultivo de microalgas es minimizar los costos energéticos de la iluminación, ya que estos determinan en gran medida el costo de los compuestos obtenidos a partir de las microalgas (Santini, 2021).

Las algas cultivadas bajo distintas intensidades de luz presentan cambios en la tasa de formación de biomasa, el contenido de pigmentos y lípidos, la estructura de ácidos grasos y la proporción. Los carotenoides a menudo son fabricados por las células como resultado de condiciones ambientales determinadas, como lo es la luz intensa. Investigaciones han demostrado que las cepas *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 y *Chlorella ohadii* que pueden crecer bajo una iluminación considerablemente alta (fotones de 3000 y 3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), respectivamente, exhiben una alta tasa de resistencia a la fotoinhibición (Treves et al., 2013; Virtanen et al., 2021; Maltsev et al., 2021).

Ahora bien, las microalgas tienen diversos tipos de pigmentos, los cuales presentan picos de absorción como se observa en la Figura 1. El conjunto de estos pigmentos posibilita a las microalgas absorber la luz en un extenso rango de longitudes de onda (Álvarez, 2018).



**Figura 1.** Máximos de absorción de pigmentos: clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas (ficocianina y ficoeritrina).

**Fuente:** *Rodríguez, 2018.*

Diferentes especies de microalgas requieren distintos espectros de luz, dependiendo de los principales pigmentos presentes en ella, lo que asociado a la intensidad lumínica constituyen parámetros importantes para el crecimiento y metabolismo (Vásquez-Villalobos et al., 2017). Permitiendo utilizar distintas longitudes de onda de luz como estrategia para favorecer la producción de pigmentos y compuestos de interés comercial (Álvarez, 2018).

### 2.3 Marco conceptual

**Cianobacterias:** microorganismos procariontes, provisto de clorofila y otros pigmentos que le proporcionan un color verde azulado, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica.

**Exopolisacáridos:** macromoléculas de carbohidratos, generalmente junto con proteínas, que se sintetizan por enzimas bacterianas y se excretan y acumulan extracelularmente dando al cultivo un aspecto mucilaginoso.

**Fitohormonas:** u hormonas vegetales, son moléculas de señalización producidas por células vegetales y que actúan sobre otras células como mensajeras químicas.

**Fotoperiodo:** tiempo en que las microalgas están en exposición a la luz y oscuridad.

**Intensidad lumínica:** indica la intensidad con la que se proyecta la luz en una dirección determinada.

## 2.4 Marco contextual

El proyecto se realizó en la Sede de Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander, en el Laboratorio de Investigación INNOValgæ.

## 2.5 Marco legal

Este trabajo presenta el siguiente marco legal ajustado a la finalidad del proyecto como lo son el artículo 80 de la Constitución Nacional de Colombia, el cual establece: “El Estado planificará

el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución. Además, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, imponer las sanciones legales y exigir la reparación de los daños causados.

De igual manera, el Decreto 1375 de 2013, por el cual se reglamentan las Colecciones Biológicas, tiene por objeto reglamentar la administración y funcionamiento de las colecciones biológicas en el territorio nacional, los derechos y obligaciones de los titulares de colecciones biológicas y el procedimiento de registro de las colecciones biológicas ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt".

Así mismo, el artículo 4 del decreto 1375 de 2003 legaliza las actividades a desarrollar en las colecciones biológicas, las cuales deben estar orientadas a proyectos científicos que permitan obtener información sobre fenómenos y procesos naturales, adelantar actividades académicas y de divulgación, de apoyo a la implementación de proyectos de conservación, para lo cual es muy importante que la información contenida en las Colecciones Biológicas se mantenga actualizada y que los especímenes sean conservados de acuerdo al Protocolo de Manejo de Colecciones Biológicas, que será elaborado por el titular.

De la misma forma, la resolución No. 1115 de 2000 del Ministerio del Medio Ambiente, por medio de la cual se determina el procedimiento para el registro de colecciones biológicas con fines de investigación científica.

### **3. Diseño metodológico**

#### **3.1 Tipo de investigación**

La investigación que se desarrollará se adapta a tipo experimental y descriptiva ya que permite comparar diferentes tratamientos de tipo de luz, fotoperiodo e intensidad lumínica. Así mismo, los conceptos teóricos sobre la naturaleza del problema serán corroborados por medio de la evaluación de los resultados obtenidos.

#### **3.2 Población y muestra**

Se emplearán 8 cepas de cianobacterias termotolerantes aisladas previamente de termales localizados en el departamento de Norte de Santander. La muestra comprenderá una alícuota representativa del medio de cultivo de las cepas de cianobacterias.

#### **3.3 Hipótesis**

A partir del control de los parámetros que caracterizan las condiciones de luz durante el cultivo de microalgas es posible obtener las condiciones lumínicas apropiadas para la producción y obtención de fitohormonas y exopolisacáridos.

### **3.4 Variables**

#### **3.4.1 Variables dependientes**

Las variables dependientes corresponden a la cuantificación de fitohormonas y exopolisacáridos extraídos del medio de cultivo.

#### **3.4.2 Variables independientes**

Las variables independientes corresponden al tipo de luz, ciclo luz/oscuridad e intensidad lumínica.

### **3.5 Fases de la investigación**

#### **❖ Reactivación de la cepa**

Las cepas de cianobacterias termotolerantes (UFPS001-UFPS011) se mantuvieron en medio BG11 sólido a  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $27^\circ\text{C}$ . Para su conservación, una vez cada 35 días las cepas fueron reinoculadas en tubos de 10 mL con 4 mL de medio BG11 (Andersen et al., 2005) la composición del medio se encuentra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Medio BG11

| COMPONENTE   | SOLUCIÓN STOCK<br>(g*L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O) | CANTIDAD UTILIZADA | Concentración final en el<br>medio (M) |
|--|---|--------------------|--|
| Ácido cítrico  | 6   | 1 ml               | 3.12 X 10 <sup>-5</sup>                |
| Amonio citrato férrico                               | 6   | 1 ml               | 3 X 10 <sup>-5</sup>                   |
| NaNO <sub>3</sub>                                    | --  | 1.5 g              | 1.76 X 10 <sup>-2</sup>                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 40  | 1 ml               | 1.75 X 10 <sup>-4</sup>                |
| MgSO <sub>4</sub>                                    | 75  | 1 ml               | 3.04 X 10 <sup>-4</sup>                |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                 | 36  | 1 ml               | 2.45 X 10 <sup>-4</sup>                |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                      | 20  | 1 ml               | 1.89 X 10 <sup>-4</sup>                |
| MgNa <sub>2</sub> EDTA                               | 1   | 1 ml               | 2.79 X 10 <sup>-6</sup>                |
| Solución de metales                                  |   | 1 ml               |  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | --  | 2.86 g             | 4.63 X 10 <sup>-5</sup>                |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                 | --  | 1.81 g             | 9.15 X 10 <sup>-6</sup>                |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | --  | 0.22 g             | 7.65 X 10 <sup>-7</sup>                |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                 | 79  | 1 ml               | 3.16 X 10 <sup>-7</sup>                |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O  | --  | 0.93 g             | 1.61 X 10 <sup>-6</sup>                |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 49.9  | 1 ml               | 1.70 X 10 <sup>-7</sup>                |

**Fuente:** *Andersen et al., 2005*

### ❖ Producción de biomasa

Cada una de las cepas se cultivó en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en frascos de borosilicato transparente de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL. El medio se agitó mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL<sub>aire</sub>/min, una radiación de 100

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 horas durante 20 días. Al finalizar el tiempo de cultivo, los frascos se desconectaron del flujo del aire y se dejaron decantar por 1 hora. El medio se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos ( $20^{\circ}\text{C}$ ). El medio libre de células se empleó para la determinación de EPS y fitohormonas.

#### ❖ **Cuantificación de EPS y fitohormonas**

Para la cuantificación de EPS se empleó el método de Fenol-ácido sulfúrico (Dubois, 1956) modificado por Moheimani et al (2013). 1 mL de medio libre de células se mezclaron con 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 Molar) en tubos de vidrio con tapa. Las muestras se incubaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Finalizado el tiempo 2 mL de muestra se mezclaron con 1 mL de solución de fenol (50 g/L) y 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en tubos de vidrio con tapa. Las muestras se mezclaron por vórtex (2000 rpm, 30 segundos) y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se leyó en un espectrofotómetro a 485 nm y se determinó la concentración de EPS empleando una curva previamente construida.

Para la cuantificación de fitohormonas se tomó 1 mL de medio y se mezcló con 4 mL de reactivo de Salkowski (60% metanol, 25%  $\text{CHCl}_3$ , 10%  $\text{HCOOH}$ , y 5%  $\text{H}_2\text{O}$ ). La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm y se determinó la concentración de IAAs (Ácido Indol acético) empleando una curva previamente construida.

❖ **Efecto del tipo de luz, ciclo luz/oscuridad e intensidad lumínica en la producción de exopolisacáridos y fitohormonas**

La cepa con mayor producción de EPS y fitohormonas fue evaluada para determinar el efecto de tres factores de luz (intensidad, ciclo luz: oscuridad y tipo de luz). Para lograr lo anterior se empleó un diseño óptimo tipo personalizado de 3 factores (2 numéricos, 1 categórico), 5 puntos de réplica y 3 puntos centrales, empleando el software Design Expert 13. Los experimentos se encuentran en la tabla 2. Cada uno de los experimentos se cultivó en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en frascos de borosilicato transparente de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL. El medio se agito mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mLaire/min. Al finalizar el tiempo de cultivo, los frascos se desconectaron del flujo del aire y se dejaron decantar por 1 hora. El medio se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos (20°C). El medio libre de células se empleó para la determinación de EPS y fitohormonas respectivamente.

**Tabla 2.** Diseño óptimo tipo personalizado para determinar el efecto de la luz.

| <b>Run</b> | <b>Factor 1</b><br><b>A: Cycle hour</b> | <b>Factor 2</b><br><b>B: Intensity <math>\mu</math>mol</b> | <b>Factor 3</b><br><b>C: Led Light</b> |
|------------|---|--|--|
| <b>1</b>   | 13.9379                                 | 40   | LR/1_5                                 |
| <b>2</b>   | 13.68                                   | 120  | white                                  |
| <b>3</b>   | 14                                      | 80   | LR_1/4                                 |
| <b>4</b>   | 6                                       | 120  | Full_Sp                                |
| <b>5</b>   | 14                                      | 80   | Full_Sp                                |
| <b>6</b>   | 6                                       | 40   | LR_1/4                                 |
| <b>7</b>   | 14                                      | 80   | LR_1/3                                 |
| <b>8</b>   | 22                                      | 40   | LR_1/3                                 |
| <b>9</b>   | 22                                      | 120  | Full_Sp                                |

|    |         |         |         |
|----|---------|---------|---------|
| 10 | 14      | 80      | Full_Sp |
| 11 | 22      | 79.6455 | LR/1_5  |
| 12 | 22      | 40      | Full_Sp |
| 13 | 22      | 100     | white   |
| 14 | 14      | 80      | white   |
| 15 | 6       | 40      | Full_Sp |
| 16 | 14      | 80      | LR/1_5  |
| 17 | 14.0632 | 120     | LR/1_5  |
| 18 | 6       | 80      | LR/1_5  |
| 19 | 9.84    | 120     | LR_1/3  |
| 20 | 22      | 120     | LR_1/3  |
| 21 | 14      | 80      | Full_Sp |
| 22 | 14      | 80      | white   |
| 23 | 14.0632 | 120     | LR/1_5  |
| 24 | 13.68   | 120     | white   |
| 25 | 14      | 120     | LR_1/4  |
| 26 | 14      | 80      | white   |
| 27 | 6       | 80      | LR/1_5  |
| 28 | 14      | 80      | LR_1/4  |
| 29 | 14      | 80      | LR_1/3  |
| 30 | 6       | 78.4    | LR_1/3  |
| 31 | 22      | 40      | white   |
| 32 | 14      | 40      | LR_1/4  |
| 33 | 14      | 80      | LR_1/3  |
| 34 | 22      | 79.6455 | LR/1_5  |
| 35 | 6       | 120     | LR_1/4  |
| 36 | 14      | 80      | LR_1/4  |
| 37 | 6       | 40      | white   |
| 38 | 14      | 80      | LR/1_5  |
| 39 | 22      | 40      | LR_1/4  |
| 40 | 10.4    | 40      | LR_1/3  |
| 41 | 13.9379 | 40      | LR/1_5  |
| 42 | 14      | 80      | LR/1_5  |
| 43 | 22      | 120     | LR_1/4  |

---

**Fuente:** *Autor.*

## 4. Resultados y análisis

### 4.1 Selección de cepas de cianobacterias termotolerantes con mayor capacidad de producción de Exopolisacáridos (EPS) y fitohormonas

Para el desarrollo de esta investigación se emplearon un total de 8 cepas de cianobacterias termotolerantes pertenecientes a géneros de *Oscillatoria* sp, *hapalosiphon* sp y *Chroococcus* sp, aisladas previamente de termales localizados en el departamento Norte de Santander y conservadas en el INNOValgae de la Universidad Francisco De Paula Santander. Con el fin de identificar las cepas de cianobacterias termolerantes con mayor capacidad de producción de fitohormonas y EPS cada uno de los aislados se cultivaron en medio BG11, con una inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mLaire/min, una radiación de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 horas durante 20 días (figura 2).

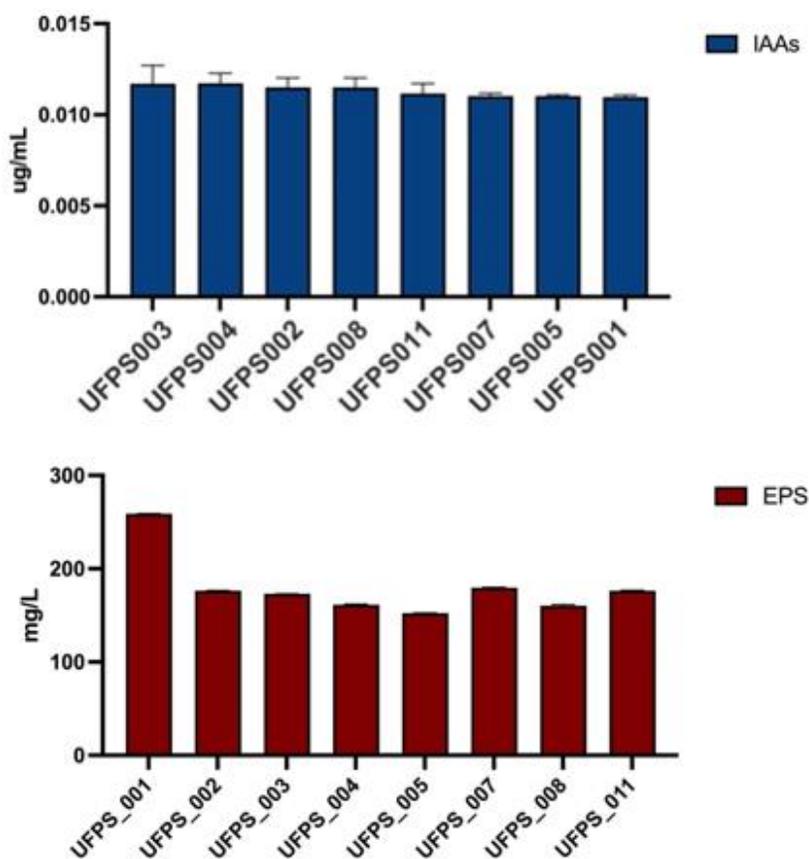


**Figura 2.** Cultivo de cepas termotolerantes en medio BG11.

**Fuente:** Autor.

Los resultados relativos al contenido de EPS y fitohormonas liberados por cada aislado se reportan en la figura 3; cómo es posible apreciar la mayor producción de EPS en mg/L fue obtenida por las cepas UFPS001, UFPS007 y UFPS002, de las cuales, las dos primeras pertenecen a géneros de *Oscillatoria* sp y la última al género de *hapaლოსiphon* sp.

En cuanto a la producción de fitohormonas, los niveles concentración de IAA (Ácido Indol acético) en  $\mu\text{g/mL}$  fue muy similar en todas las cianobacterias evaluadas. Sin embargo, las mayores cantidades fueron obtenidas en las cepas UFPS003, UFPS004 y UFPS002, de las cuales igualmente las dos primeras pertenecen *Oscillatoria* sp y la última al género de *Hapalosiphon* sp.



**Figura 3.** Producción de Fitohormonas y exopolisacáridos de cepas termotolerantes.

**Fuente:** *Autor.*

La mayor parte de los EPS liberados por las bacterias y cianobacterias poseen como propósito primordial defender las células de cualquier tipo de estrés físico o químico y se comportan como materiales de protección (Garlapati et al., 2019). Por lo tanto, la producción de EPS es una condición que se encuentra estrechamente relacionada con la capacidad de tolerar condiciones estresantes, bien sea deficiencia de macro y micronutrientes, salinidad, temperatura o irradiancia. Muchas cepas del género *Oscillatoria* sp se describen como fuertes productores de EPS. Veerabhadhran et al., (2018) registraron una mayor cantidad de polisacáridos capsulares/unidos (CPS) en *Oscillatoria* sp (AP17) en contraste con cianobacterias *Leptolyngbya* sp (AP3b) y *Chroococcus* sp (AP3U) cultivados en matraz cónico-cilíndrico (CCF). Estudios confirman la presencia de EPS de *Oscillatoria* sp como agente antibiopelícula novedoso contra *P. aeruginosa* PA14 causante de problemas importantes como la infección clínica, la contaminación de los alimentos y la bioincrustación marina (ArunKumar et al., 2018). Así mismo se ha reportado el potencial de adsorción de cromo de un exopolisacárido (EPS) liberado durante el crecimiento de la cianobacteria *Oscillatoria trichoides* Szafer, sugiriendo que el EPS puede ser utilizado en biorremediación (Miranda & Krishnakumar, 2018).

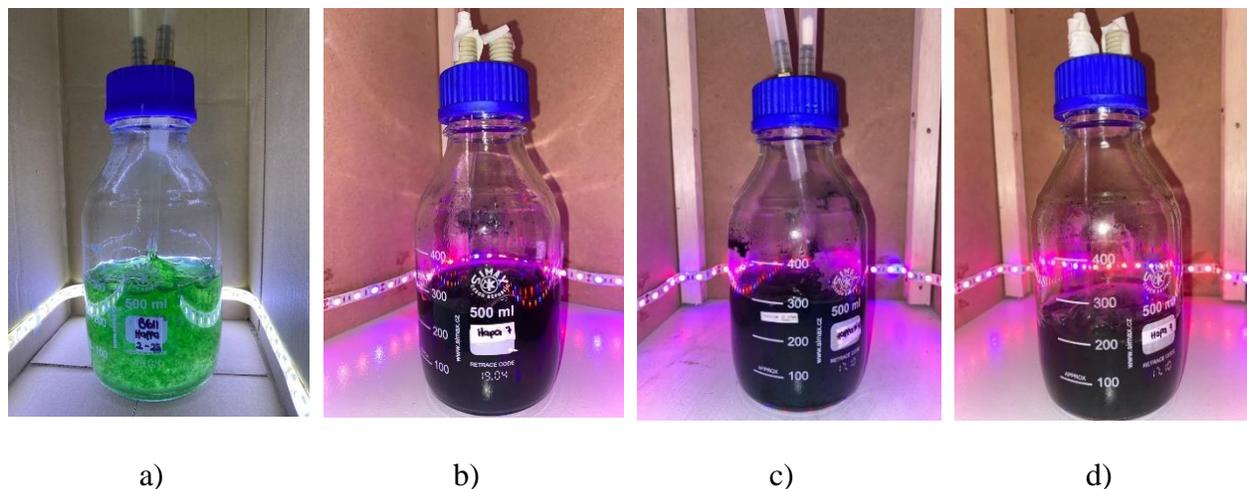
Algunas especies pertenecientes al género *Hapalosiphon* sp se han propuesto como nuevo método para mejorar los suelos afectados por la salinidad, al encontrarse en formas predominantes en ambientes salinos, cualidad que aseguran posiblemente es atribuida gracias a la producción de polisacáridos extracelulares (Chatterjee et al., 2017). La cepa *Hapalosiphon fontinalis* se ha

reseñado como una fuente rica de varios polisacáridos con cualidades empleables como flocculantes, surfactantes y otros (Becker, 1994; Sharma et al., 2019). De acuerdo con Gayathri et al., (2017), cepas de cianobacterias pertenecientes a géneros de *Hapalosiphon* sp y *Oscillatoria* sp, liberan cantidades variadas de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas), polipéptidos, aminoácidos, polisacáridos para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En concordancia con Yadav (2021) los biofertilizantes que incluyen microalgas, en especial cianobacterias, promueven el incremento de las plantas y la condición del suelo mejorando la cantidad de nutrientes presentes en el a través de la secreción de fitohormonas como auxina (*Nostoc*, *Hapalosiphon*), giberelinas, vitaminas como la vitamina B12 (*Cylindrospermum* sp. *Tolypothrix tenuis*, *Nostoc muscorum* y *Hapalosiphon fontinalis*), aminoácidos (Roger y Pierre-Adrien 1982; Rodríguez et al. 2006), fijando nitrógeno y liberando nutrientes después de su muerte y descomposición.

#### **4.2 Determinación del efecto de la calidad de la luz, ciclo de luz e intensidad en la producción de EPS y fitohormonas**

Con base en los resultados anteriores la cepa que se identificó como mayor productora tanto de exopolisacáridos como de fitohormonas pertenece al género *Hapalosiphon* sp. La cepa UFPS 002 se evaluó para determinar el efecto de tres factores de luz (intensidad, ciclo luz: oscuridad y tipo de luz). Cada uno de los experimentos se cultivó en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en frascos de borosilicato transparente de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL. El medio se agitó mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL<sub>aire</sub>/min. El análisis de metabolitos se realizó por duplicado para cada experimento (figura 4). Cabe resaltar que la determinación el efecto de la luz full spectrum en la producción de EPS y fitohormonas no fue

posible debido a que las intensidades de luz no fueron medibles para los experimentos propuestos en este ensayo.



**Figura 4.** Cultivo de *Hapalosiphon* sp empleando luz blanca (a), luz roja/azul 1:3 (b), luz roja: azul 4:1 (c) y luz roja: azul 5:1 (d).

**Fuente:** Autor.

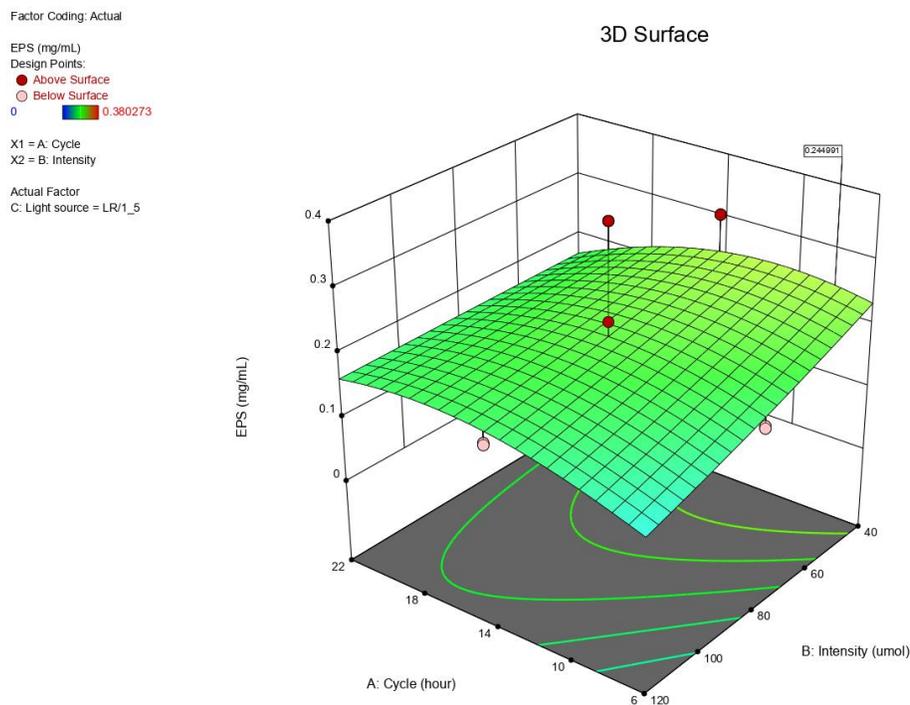
De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la producción de exopolisacáridos (EPS), en el análisis de ANOVA (tabla 3) se mostró que el F-value obtenido fue de 15.67, lo anterior permitió inferir que el modelo fue significativo; cabe resaltar que solo existe un 0.01% de probabilidad de que este valor tan grande se deba a problemas relacionados con el ruido de los datos (alta desviación, error en el muestreo, etc). Por otro lado, en la tabla 3 se pudo observar que factores B, C y  $A^2$  (intensidad, tipo de luz y el ciclo de luz: oscuridad) son los factores que más afectan la deposición de EPS. Finalmente, el  $R^2$  obtenido fue de 0.91, lo cual indica que los valores se encuentran ajustados.

**Tabla 3.** ANOVA de EPS

| Source                | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value  |                 |
|-----------------------|----------------|----|-------------|---------|----------|-----------------|
| <b>Model</b>          | 1.03           | 17 | 0.0608      | 15.67   | < 0.0001 | significant     |
| <b>A-Cycle</b>        | 0.0088         | 1  | 0.0088      | 2.28    | 0.1440   |                 |
| <b>B-Intensity</b>    | 0.0179         | 1  | 0.0179      | 4.61    | 0.0418   |                 |
| <b>C-Light source</b> | 0.8674         | 4  | 0.2168      | 55.89   | < 0.0001 |                 |
| <b>AB</b>             | 0.0164         | 1  | 0.0164      | 4.22    | 0.0506   |                 |
| <b>AC</b>             | 0.0255         | 4  | 0.0064      | 1.64    | 0.1944   |                 |
| <b>BC</b>             | 0.0129         | 4  | 0.0032      | 0.8294  | 0.5191   |                 |
| <b>A<sup>2</sup></b>  | 0.0173         | 1  | 0.0173      | 4.45    | 0.0450   |                 |
| <b>B<sup>2</sup></b>  | 6.471E-06      | 1  | 6.471E-06   | 0.0017  | 0.9677   |                 |
| <b>Residual</b>       | 0.0970         | 25 | 0.0039      |         |          |                 |
| <b>Lack of Fit</b>    | 0.0583         | 10 | 0.0058      | 2.26    | 0.0752   | not significant |
| <b>Pure Error</b>     | 0.0387         | 15 | 0.0026      |         |          |                 |
| <b>Cor Total</b>      | 1.13           | 42 |             |         |          |                 |

**Fuente:** *Autor.*

La superficie de respuesta para EPS (figura 5) indicó que bajas intensidades y ciclos de luz medio (11 horas) usando luces LED Roja: Azul (5:1) maximizó la concentración de EPS en la cepa UFPS 002.



**Figura 5.** Superficie de respuesta para la producción de EPS.

**Fuente:** Autor.

La luz roja y azul se han descrito como un factor inductor en la producción de EPS. *Nostoc flagelliforme*, por ejemplo, tiene una mayor tasa de crecimiento y acumulación de exopolisacáridos y polisacáridos capsulares bajo luz monocromática, es decir, luz roja y azul en comparación con la luz blanca (Han et al., 2014; Han et al., 2017; Cruz et al., 2020). Así mismo, en un estudio realizado por You & Barnett. (2004) en *Porphyridium cruentum*, la aplicación de longitudes de onda LED multicromáticas (rojo, verde y azul: 620–625, 520–525 y 465–468 nm, respectivamente) en el cultivo indujo un aumento en el rendimiento de EPS (Babiak & Krzemińska, 2021).

Cuando los cultivos microalgales son sometidos a variaciones ambientales se produce la liberación de EPS como un mecanismo fundamental de tolerancia a las condiciones estresantes. La incidencia de la luz roja: azul posiblemente estimularon la protección de las células mediante la producción de EPS.

Muchas investigaciones han evidenciado que la intensidad de la luz puede mejorar la producción de EPS. Un aumento en la intensidad de la luz puede favorecer la producción de EPS en la cianobacteria *Arthrospira* sp (Chentir et al., 2017). De la misma forma, Ge et al. (2014) observaron que para *Nostoc* sp una intensidad de luz alta de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  favorecía un mayor contenido de exopolisacáridos y polisacáridos capsulares entre 206,2 y 71,9 mg/g, respectivamente, mientras que, con una intensidad  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la microalga acumuló 155,4 mg/g de exopolisacáridos y 57,7 mg/g de polisacáridos capsulares. No obstante, es muy posible encontrar una proporción alta de EPS a bajas intensidades de luz, como el análisis realizado por Clément-Larosière. (2014), en la cual la producción específica de EPS de *C. vulgaris* (excretada por célula) disminuyó al aumentar la intensidad de la luz ( $50, 120, 180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La producción de EPS específica más alta se registró con la intensidad de luz más baja de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En este sentido, se puede asegurar que los resultados de las investigaciones del efecto de la intensidad de la luz también indican que la respuesta de las células productoras de EPS a una alta intensidad de luz es específica de la especie (Babiak & Krzemińska, 2021).

Para el caso de las fitohormonas, el análisis de ANOVA (tabla 4) reportó que el F-value obtenido fue de 25.62, lo anterior permitió inferir que el modelo fue significativo; cabe resaltar que solo existe un 0.01% de probabilidad de que este valor tan grande se deba a problemas relacionados

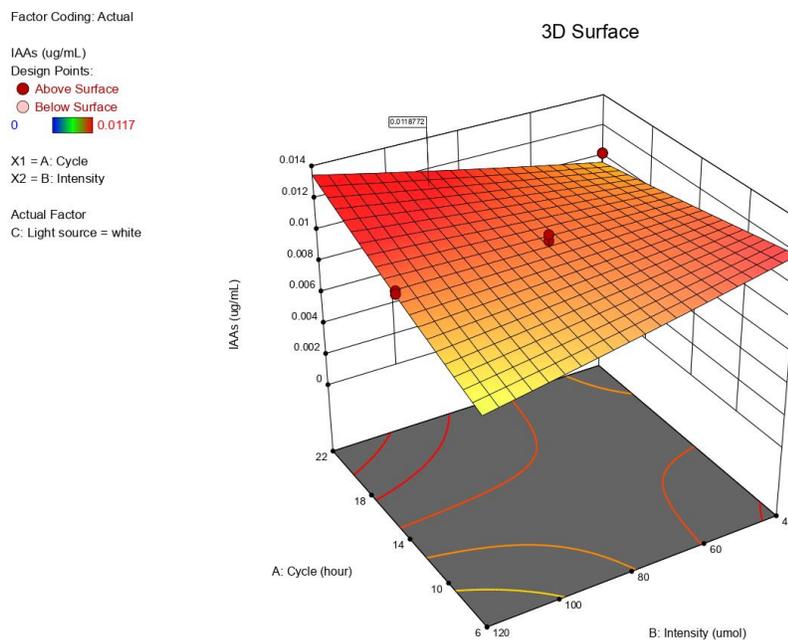
con el ruido de los datos. Por otro lado, se pudo observar que factores C (fuente de luz), y las interacciones AB y AC (ciclo de luz-intensidad; y ciclo de luz-fuente de luz) son los factores que más afectan la deposición de EPS. Finalmente, el  $R^2$  obtenido fue de 0.93, lo cual indica que los valores se encuentran ajustados.

**Tabla 4.** ANOVA de IAAs.

| Source                | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value  |             |
|-----------------------|----------------|----|-------------|---------|----------|-------------|
| <b>Model</b>          | 0.0648         | 15 | 0.0043      | 25.62   | < 0.0001 | significant |
| <b>A-Cycle</b>        | 0.0006         | 1  | 0.0006      | 3.38    | 0.0770   |             |
| <b>B-Intensity</b>    | 0.0005         | 1  | 0.0005      | 2.72    | 0.1107   |             |
| <b>C-Light source</b> | 0.0590         | 4  | 0.0147      | 87.36   | < 0.0001 |             |
| <b>AB</b>             | 0.0009         | 1  | 0.0009      | 5.45    | 0.0273   |             |
| <b>AC</b>             | 0.0021         | 4  | 0.0005      | 3.17    | 0.0293   |             |
| <b>BC</b>             | 0.0012         | 4  | 0.0003      | 1.82    | 0.1542   |             |
| <b>Residual</b>       | 0.0046         | 27 | 0.0002      |         |          |             |
| <b>Lack of Fit</b>    | 0.0045         | 12 | 0.0004      | 307.01  | < 0.0001 | significant |
| <b>Pure Error</b>     | 0.0000         | 15 | 1.232E-06   |         |          |             |
| <b>Cor Total</b>      | 0.0694         | 42 |             |         |          |             |

**Fuente:** Autor.

La superficie de respuesta para fitohormonas indicó que bajas intensidades y ciclos de luz (6 horas) medio usando luz blanca maximizó la concentración final de fitohormonas en la cepa UFPS 002.



**Figura 6.** Superficie de respuesta para la producción de Fitohormonas.

**Fuente:** Autor.

Algunos estudios manifiestan que los cultivos algales sometidos a ciclos de luz y oscuridad poseen concentraciones de ácido Indol-3-acético (IAA) más altas que aquellos sometidos a oscuridad continua, lo que confirma que la luz está involucrada en la biosíntesis de IAA de las algas (Prasanna et al. 2009; Ahmed et al. 2010; Stirk et al. 2014; Tan et al., 2021). De la misma forma, Stirk et al. (2014) exponen que las concentraciones de auxina en *Chlorella minutissima* se vieron afectadas por la luz, aumentando con el tiempo en los cultivos con ciclo de luz: oscuridad, y por el contrario manteniéndose bajas en cultivos de oscuridad continua.

La luz pertenece a uno de los reguladores clave del periodo celular e interactúa con las hormonas vegetales. Tanto la intensidad de la luz como el periodo de alternancia de luz y oscuridad, o sea, el fotoperiodo, son relevantes. La cantidad y calidad de la luz se refleja en la proporción de energía disponible para la fotosíntesis. Los ciclos alternos de luz y oscuridad exhiben las condiciones naturales del medio ambiente en el desarrollo de las algas (Krzemińska et al., 2014, 2015; Strik et al., 2014; Magierek et al., 2017). Aunque la luz blanca fue de los factores más significativos, en este trabajo no se evidencian reportes de su influencia en otras investigaciones. Sin embargo, se demostró la importancia de esta variable en la biosíntesis de IAA y en el rendimiento de la cepa.

A partir de los resultados se obtuvieron las condiciones experimentales (tabla 5) donde se buscó maximizar la producción de los diferentes metabolitos (E1, E2) y una respuesta que buscó maximizar los dos metabolitos en un solo proceso de cultivo (E3).

**Tabla 5.** Condiciones de comprobación.

| Experimento | Ciclo de luz (h:h) | Intensidad ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Tipo de luz      | Respuesta |
|-------------|--------------------|---|------------------|-----------|
| E1          | 11                 | 40  | Roja: Azul (5:1) | EPS       |
| E2          | 6.5                | 40  | Blanca           | IAAs      |
| E3          | 8                  | 40  | Roja: Azul (5:1) | EPS+IAAs  |

**Fuente:** Autor.

Teniendo en cuenta las anteriores condiciones, se realizaron nuevos experimentos (figura 7) para comprobar los resultados esperados.



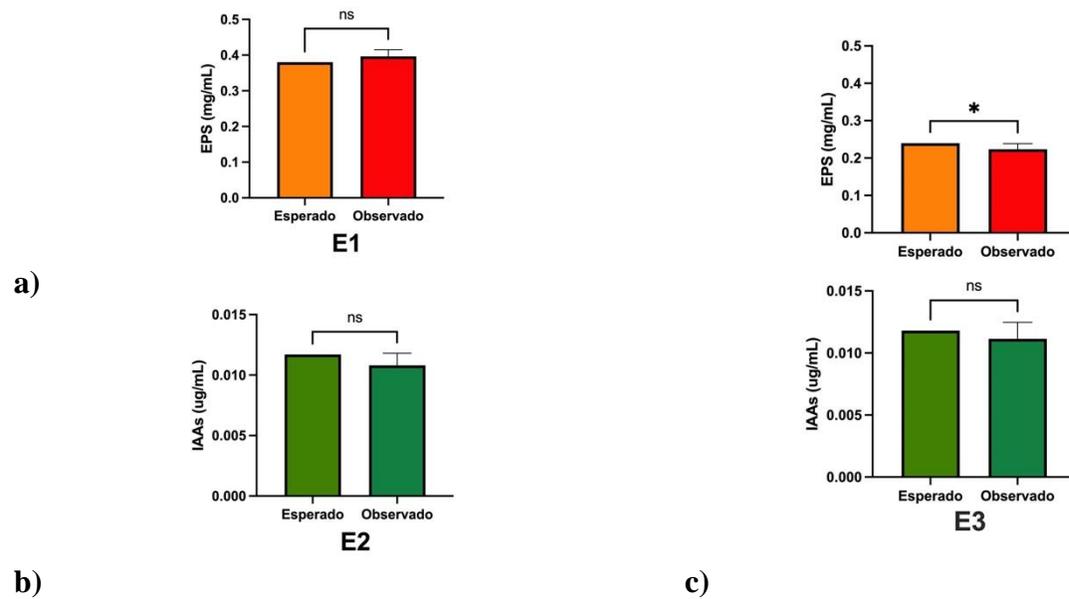
E1

E2

E3

**Figura 7.** Cultivo de *Hapalosiphon* sp empleando luz roja/azul 5:1 (E1 Y E2) y luz blanca (E2).

**Fuente:** Autor.



**Figura 8.** Análisis experimental para las tres condiciones.

**Fuente:** Autor.

De acuerdo con los resultados obtenidos (figura 8), las concentraciones de EPS y fitohormonas se encuentran dentro de lo esperado por el modelo obtenido. Por lo cual es posible afirmar que las condiciones propuestas permiten una producción interesante de estos dos metabolitos.

Finalmente, se realizó una comparación bibliográfica de las concentraciones liberadas tanto de EPS como de fitohormonas en diferentes especies de microalgas y cianobacterias bajo diferentes parámetros de luz.

**Tabla 6.** Comparación de las concentraciones de exopolisacáridos y fitohormonas en microalgas y cianobacterias bajo diferentes condiciones de luz.

| EXOPOLISACARIDOS             |                   |  |                     |              |                             |
|------------------------------|-------------------|--|---------------------|--------------|-----------------------------|
| Cepa                         | Color de LED      | Intensidad<br>$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | Ciclo de luz<br>h/h | EPS<br>mg/mL | Referencia                  |
| <i>Porphyridium curenium</i> | Luz azul          | 40   | 24                  | 4.63         | You & Barnett (2004)        |
|                              | Luz roja          |  |                     | 4.57         |                             |
|                              | Luz blanca: azul  |  |                     | 4.19         |                             |
| <i>Nostoc flagelliforme</i>  | Luz azul          | 60   | 24                  | 0.032        | Han et al (2014)            |
|                              | Luz roja          |  |                     | 0.031        |                             |
| <i>P. curenium</i>           | Luz blanca        | 80   | 18:6                | 0.96         | Li Qin et al (2008)         |
|                              |                   | 40   | 24                  | 155.49       | Ge et al (2014)             |
| <i>Nostoc sp</i>             | Luz azul          | 80   | 24                  | 206.20       | Medina-Cabrera et al (2020) |
|                              |                   | n/a  | 12:12               | 0.10         |                             |
| <i>P. sordidum</i>           | Luz naranja: roja | n/a  | 12:12               | 0.01         | Medina-Cabrera et al (2020) |
|                              | Luz blanca        |  |                     | 0.12         |                             |
|                              | Luz azul          |  |                     | 0.03         |                             |
| <i>P. purpureum</i>          | Luz naranja: roja | n/a  | 12:12               | 0.09         | Medina-Cabrera et al (2020) |
|                              | Luz blanca        |  |                     | 0.14         |                             |

| <i>Hapalosiphon sp</i>               | Luz roja: azul 5:1 | 40   | 11:13               | 0.147                 | Este trabajo          |
|--------------------------------------|--------------------|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| FITOHORMONAS                         |                    |  |                     |                       |                       |
| Cepa                                 | Color de LED       | Intensidad<br>$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | Ciclo de luz<br>h/h | Fitohormonas<br>ug/mL | Referencia            |
| <i>Anabaena sp. CW1</i>              |                    |  | 24                  | $\pm 10.5$            | Prasanna et al (2010) |
|                                      |                    |  | 16:8                | $\pm 8.2$             |                       |
|                                      |                    |  | 0:0                 | $\pm 0.82$            |                       |
| <i>Anabaena sp. RP9</i>              | n/a                | n/a  | 24                  | $\pm 6.5$             | Ahmed et al (2014)    |
|                                      |                    |  | 16:8                | $\pm 3.8$             |                       |
|                                      |                    |  | 0:0                 | $\pm 0.38$            |                       |
| <i>Chroococcidiopsis sp. MMG-5</i>   |                    |  | 8:16                | 40                    | Ahmed et al (2014)    |
|                                      |                    |  | 24                  | 34                    |                       |
|                                      |                    |  | 0:0                 | 0                     |                       |
| <i>Synechocystis sp. MMG-8</i>       |                    |  | 8:16                | 42                    | Duong et al (2021)    |
|                                      |                    |  | 24                  | 35                    |                       |
|                                      |                    |  | 0:0                 | 0                     |                       |
| <i>Planktothricoides raciborskii</i> | Luz Fluorescente   |  | 12:12               | 3,04                  | Wenz et al (2019)     |
| <i>Anabaena sp</i>                   | Luz natural        |  | 12:12               | 0.189                 | Este trabajo          |
| <i>Hapalosiphon sp</i>               | Luz blanca         | 40   | 6:18                | 0.010                 |                       |

**Fuente:** Autor.

Diferentes longitudes de onda de luz tienen la posibilidad de ejercer importantes efectos sobre las microalgas gracias a su naturaleza fotosintética (Li et al., 2019). Se ha reportado a la luz azul y roja como las más adecuadas para el crecimiento y la producción de EPS para microalgas y cepas de cianobacterias (Han et al., 2014). En concordancia con You & Barnett. (2004) la luz azul y roja en bajas intensidades favorecen una mayor producción de EPS en *Porphyridium curenium* en comparación con la mezcla de luz blanca y azul. De igual manera, en *N. flageliforme*, la producción de EPS de las células cultivadas con luz azul y luz roja fue 1,65 y 1,59 veces mayor que la de las células cultivadas con luz blanca. No obstante, también se ha informado una producción considerable de EPS en esta cepa bajo efectos de la luz blanca. Como lo describe Liqin et al. (2008), donde producción de EPS por *Porphyridium cruentum* aumentó con un aumento en la intensidad de la luz hasta el punto de saturación de luz lográndose el nivel más alto de producción a una intensidad

de luz de  $80 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Como se ha mencionado anteriormente, la intensidad de la luz puede mejorar la producción de exopolisacáridos. En investigaciones de *Nostoc* sp, bajo efecto de luz blanca, la cianobacteria produjo una mayor concentración de EPS con el aumento en la intensidad de la luz  $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Ge et al. (2014). De la misma forma, para *P. sordidum* y *P. purpureum*, la luz blanca fue generalmente más adecuada para la tasa de crecimiento y la producción de EPS, aunque se reportaron concentraciones significativas cuando las cepas crecieron en luz naranja/roja Medina-Cabrera et al. (2020). En esta investigación, *Hapalosiphon* sp obtuvo una máxima producción de EPS bajo luz roja; azul y bajas intensidades de luz. Estas condiciones concuerdan con las informadas por You & Barnett. (2004) en cepas de *Porphyridium curentum*. De esta manera, estos resultados indican que las longitudes de onda de la luz, y medianas y altas intensidades tienen efectos importantes en la producción de exopolisacáridos. Ahora bien, la influencia de la misma luz en la producción de polisacáridos fue significativamente diferente entre varias cepas, lo que sugiere que los efectos de las longitudes de onda de la luz en la producción de polisacáridos pueden variar según las cepas (Han et al., 2014).

Referente a la producción de fitohormonas son escasos los estudios que informan sobre el color de la luz y su calidad. Se hallan más estudios respecto a los periodos de luz: oscuridad, al ser considerado uno de los factores más importantes para las cianobacterias ya que sus actividades metabólicas generalmente se estimulan con el aumento del fotoperiodo. Prasanna et al. (2010) registraron resultados interesantes en la mejora de la producción de IAA en dos cepas de cianobacterias incubadas en condiciones de luz y oscuridad. *Anabaena* sp. CW1 y *Anabaena* sp. RP9 fueron sometidas a condiciones luz continua (CL), ciclos luz:oscuridad (16L:8D) y oscuridad total (CD), los resultados revelaron una mejor concentración de IAA bajo condiciones de iluminación. La exposición continua a la luz fue más favorable para la producción de IAA en ambas

cepas. Mientras que los sometidos en oscuridad continua obtuvieron un 10 % menos de los valores registrados en condiciones de iluminación. De la misma forma Ahmed et al. (2014) observó una diferencia considerable en la biosíntesis de auxina por parte de las cianobacterias *Chroococidiopsis* sp. MMG-5 y *Synechocystis* sp. MMG-8 incubadas bajo varios regímenes de luz: oscuridad. Aunque se produjo una concentración alta de IAA en iluminación continua el IAA máximo se detectó en un ciclo de luz: oscuridad de 8:16 h. Las cianobacterias no crecieron en la oscuridad y, en consecuencia, no se produjo IAA. Doung et al. (2014) identificaron un comportamiento similar por la cianobacteria *Planktothricoides raciborskii* al producir una alta cantidad de auxinas bajo un ciclo de luz: oscuridad 12:12 h. En conformidad con Wenz et al. (2019) la cianobacteria *Anabaena* sp bajo en condiciones de luz natural y simulación de un periodo de luz: oscuridad 12:12 h produjo una concentración significativa de IAA. Aunque la biosíntesis y regulación de las fitohormonas no se ha descifrado por completo y se registran muchas diferencias en las concentraciones emitidas por las diversas cepas. En este estudio se identificó que en cepas de *Hapalosiphon* sp una mayor producción de fitohormonas se llevó a cabo empleando luz blanca, bajas intensidad de luz, y un ciclo de luz: oscuridad 6:18 h.

## Conclusiones

*Hapalosiphon* sp se estableció como la cianobacteria termotolerante con mejor capacidad de producción tanto de fitohormonas como de exopolisacáridos. Especies de *Hapalosiphon* sp se han referido como una fuente rica de varios polisacáridos, así como de diversas fitohormonas tales como auxinas, giberelinas y citoquininas.

Este estudio reveló que la calidad de la luz tuvo efectos considerables en la producción tanto de exopolisacáridos como de fitohormonas al evidenciarse una fuerte dependencia a los espectros de luz. El análisis de los resultados indicó que en la producción de EPS, los factores más importantes corresponden a la intensidad y el color de la luz. Mientras que en IAA influye solo el color de la luz. Para la cianobacteria *Hapalosiphon* sp la máxima producción de EPS se lleva a cabo empleando luz LED Roja: Azul (5:1), bajas intensidades y ciclos de luz medio (11 h) con una concentración de 0.147 mg/mL. Por su parte, la producción máxima de fitohormonas se presenta bajo luz Blanca, bajas intensidades y ciclos de luz medio (6 horas) con una concentración de 0,010 ug/mL.

El ciclo de luz/oscuridad no se precisó como un factor determinante en la producción de fitohormonas y EPS en este trabajo. Sin embargo, conforme a la literatura la producción de EPS se vio favorecida bajo condiciones continuas de luz. En cuanto a la producción de fitohormonas se encontró una mejora significativa en presencia de iluminación en lugar de condiciones de oscuridad. Estas diferencias pueden deberse a que cada cepa de cianobacteria presenta condiciones específicas de crecimiento y liberación de los diferentes compuestos.

## Recomendaciones

La capacidad que tienen las cianobacterias para sintetizar ciertos metabolitos secundarios se encuentra regulada por las condiciones en las que se lleva a cabo su cultivo. Entre los diferentes parámetros que pueden influir en la producción de estas sustancias la luz es uno de los más importantes a considerar. La incidencia de la luz es un factor que no solo afecta la morfología de los filamentos, sino que, además tiene un fuerte control en la tasa de crecimiento y la composición de las microalgas. No obstante, diferentes especies de estos microorganismos requieren distintos espectros y condiciones de luz, dependiendo de los principales pigmentos presentes en ella, por lo que se recomienda identificar los requerimientos propios de cada cepa antes de su escalado y producción.

Son varios factores los que afectan el crecimiento de las cianobacterias, como el medio de cultivo, el pH, el CO<sub>2</sub>, la temperatura, la salinidad, y cada uno de ellos desempeña un papel clave en relación con la producción de un compuesto determinado. Por ello, es preciso identificar el rango de valores adecuados para cada parámetro y su interacción con los demás para lograr una mejor producción y utilidad del proceso.

## Referencias bibliográficas

- Ahmed, M., Stal, L. J. & Hasnain, S. (2014). Biofilm Formation and Indole-3-Acetic Acid Production by Two Rhizospheric Unicellular Cyanobacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1015-1025. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10099>
- Álvarez, P., Influencia de la luz sobre la producción y la composición de la biomasa microalgal de *Spirulina platensis* LMPA55. Dpto. de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica Nacional Buenos Aires (2018).
- Andersen, R., Berges, J., Harrison, P., & Watanabe, M. (2005). Recipes for Freshwater and Seawater Media. In Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier.
- ArunKumar, M., Divya, S., LewisOscar, F., Thajuddin, N., & Nithya, C. (2018). Cyanobacterial exopolysaccharides: A potent antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*.
- Babiak, W., & Krzemińska, I. (2021). Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes. *Energies*, 14(13), 4007. <https://doi.org/10.3390/en14134007>
- Borah, D., Nainamalai, S., Gopalakrishnan, S., Rout, J., Alharbi, N. S., Alharbi, S. A., & Nooruddin, T. (2018). Biolubricant potential of exopolysaccharides from the cyanobacterium *Cyanothece epiphytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3635–3647. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8892-x>
- Chamizo, S., Adessi, A., Torzillo, G., & De Philippis, R. (2020). Exopolysaccharide Features Influence Growth Success in Biocrust-forming Cyanobacteria, Moving From Liquid Culture to Sand Microcosms. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.568224>
- Chatterjee, A., Singh, S., Agrawal, C., Yadav, S., Rai, R., & Rai, L. (2017). Role of Algae as a Biofertilizer. *Algal Green Chemistry*, 189–200. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63784-0.00010-2>

- Chentir, I., Hamdi, M., Doumandji, A., HadjSadok, A., Ouada, H. B., Nasri, M., & Jridi, M. (2017). Enhancement of extracellular polymeric substances (EPS) production in *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) by two-step cultivation process and partial characterization of their polysaccharidic moiety. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 1412–1420. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.009>
- Cruz, D., Vasconcelos, V., Pierre, G., Michaud, P., & Delattre, C. (2020). Exopolysaccharides from Cyanobacteria: Strategies for Bioprocess Development. *Applied Sciences*, *10*(11), 3763. <https://doi.org/10.3390/app10113763>
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, *34*(7), 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Duong, T. T., Nguyen, T. T. L., Dinh, T. H. V., Hoang, T. Q., Vu, T. N., Doan, T. O., Dang, T. M. A., Le, T. P. Q., Tran, D. T., Le, V. N., Nguyen, Q. T., Le, P. T., Nguyen, T. K., Pham, T. D., & Bui, H. M. (2021). Auxin production of the filamentous cyanobacterial *Planktothricoides* strain isolated from a polluted river in Vietnam. *Chemosphere*, *284*, 131242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131242>
- Escárcega-González, C. E., Garza-Cervantes, J. A., Vázquez-Rodríguez, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2018). Bacterial Exopolysaccharides as Reducing and/or Stabilizing Agents during Synthesis of Metal Nanoparticles with Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, *2018*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/7045852>
- Fukushima, S., Motoyama, K., Tanida, Y., Higashi, T., Ishitsuka, Y., Kondo, Y., Irie, T., Tanaka, T., Ihn, H., & Arima, H. (2016). Clinical Evaluation of Novel Natural Polysaccharides Sacran as a Skincare Material for Atopic Dermatitis Patients. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, *06*(01), 9–18. <https://doi.org/10.4236/jcdsa.2016.61002>

- Garlapati, D., Chandrasekaran, M., Devanesan, A., Mathimani, T., & Pugazhendhi, A. (2019). Role of cyanobacteria in agricultural and industrial sectors: an outlook on economically important byproducts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(12), 4709–4721. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09811-1>
- Gayathri, M., Shunmugam, S., Thajuddin, N., & Muralitharan, G. (2017). Phytohormones and free volatile fatty acids from cyanobacterial biomass wet extract (BWE) elicit plant growth promotion. *Algal Research*, *26*, 56–64. doi:10.1016/j.algal.2017.06.022
- Ge, H., Xia, L., Zhou, X., Zhang, D., & Hu, C. (2014). Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the cyanobacteria *Nostoc* sp. *Journal of Microbiology*, *52*(2), 179–183. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-2720-5>
- Guevara, M., Pinto, R., Villarroel, J., Hernández, E., Díaz, R., Gotera, B., & Cortez, R. (2016). Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de *Dunaliella* salina, proveniente de las salinas de Araya, Venezuela. *Saber*, *28*(3), 494-501.
- Han, P. P., Shen, S. G., Wang, H. Y., Sun, Y., Dai, Y. J., & Jia, S. R. (2015). Comparative metabolomic analysis of the effects of light quality on polysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Algal Research*, *9*, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.019>
- Han, P., Sun, Y., Jia, S., Zhong, C., & Tan, Z. (2014). Effects of light wavelengths on extracellular and capsular polysaccharide production by *Nostoc flagelliforme*. *Carbohydrate Polymers*, *105*, 145–151. doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.061
- Kumar, G., Teli, B., Mukherjee, A., Bajpai, R., & Sarma, B. K. (2019). Secondary Metabolites from Cyanobacteria: A Potential Source for Plant Growth Promotion and Disease Management. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*, 239–252. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_12)
- López-Padrón, I., Martínez-González, L., Pérez-Domínguez, G., Reyes-Guerrero, Y., Núñez-Vázquez, M., & Cabrera-Rodríguez, J. A. (2020). Las algas y sus usos en la agricultura. Una visión actualizada. *Cultivos tropicales*, *41*(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0258-59362020000200010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362020000200010)

- Liqin, S., Wang, C., & Lei, S. (2008). Effects of light regime on extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum* cultured in flat plate photobioreactors. *2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*.
- Magierek, E., Krzemińska, I., & Tys, J. (2017). *Stimulatory effect of indole-3-acetic acid and continuous illumination on the growth of Parachlorella kessleri*. *International Agrophysics*, 31(4), 483–489. doi:10.1515/intag-2016-0070
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology*, 10(10), 1060. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>
- Medina-Cabrera, E. V., Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2020). Optimization of growth and EPS production in two *Porphyridium* strains. *Bioresource Technology Reports*, 100486. doi:10.1016/j.biteb.2020.100486
- Miranda, J., & Krishnakumar, G. (2018). Partial characterization of the exopolysaccharide from *Oscillatoria trichoides* Szafer and the role of released polysaccharide in sequestration of Cr<sup>6+</sup>. *Remediation Journal*, 28(4), 51–64. doi:10.1002/rem.21576
- Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A., Isdepsky, A., & Sing, S. F. (2013). *Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition BT - Algae for Biofuels and Energy* (M. A. Borowitzka & N. R. Moheimani (eds.); pp. 265–284). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_16)
- Mota, R., Rossi, F., Andrenelli, L., Pereira, S. B., De Philippis, R., & Tamagnini, P. (2016). Released polysaccharides (RPS) from *Cyanothece* sp. CCY 0110 as biosorbent for heavy metals bioremediation: interactions between metals and RPS binding sites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17), 7765–7775. doi:10.1007/s00253-016-7602-9
- Mota, R., Vidal, R., Pandeirada, C., Flores, C., Adessi, A., De Philippis, R., Nunes, C., Coimbra, M. A., & Tamagnini, P. (2020). Cyanoflan: A cyanobacterial sulfated carbohydrate polymer with emulsifying properties. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115525. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115525>

- Parwani, L., Bhatt, M., & Singh, J. (2021). Potential Biotechnological Applications of Cyanobacterial Exopolysaccharides. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200401>
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., & Nain, L. (2010). Modulation of IAA production in cyanobacteria by tryptophan and light. *Polish Journal of Microbiology*, 59(2), 99.
- Potnis, A. A., Raghavan, P. S., & Rajaram, H. (2021). Overview on cyanobacterial exopolysaccharides and biofilms: role in bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(3), 781–794. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09586-w>
- Qian, L., Wu, L., Yang, L., & Zhang, Z. (2020). Inoculation concentration modulating the secretion and accumulation pattern of exopolysaccharides in desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(2), 330–337. <https://doi.org/10.1002/bab.1930>
- Ramos, R., & Pizarro, R. (2018). Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de biología marina y oceanografía*, 53(1), 75–86. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572018000100075>
- Raungsomboon, S., Chidthaisong, A., Bunnag, B., Inthorn, D., & Harvey, N. W. (2006). Production, composition and Pb<sup>2+</sup> adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. *Water Research*, 40(20), 3759–3766. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.013>
- Romeral, G., Gómez, J., Sanz, M., Chirivella Martorell, J., & Aroca, A. (2017). Principios de biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis. revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos Modelización y Simulación*, 115-129.
- Santini, G., Biondi, N., Rodolfi, L., & Tredici, M. R. (2021). Plant Biostimulants from Cyanobacteria: An Emerging Strategy to Improve Yields and Sustainability in Agriculture. *Plants*, 10(4), 643. <https://doi.org/10.3390/plants10040643>

- Sharma, P., Slathia, P. S., Raina, N., & Bhagat, D. (2019). Microbial diversity in freshwater ecosystems and its industrial potential. *Freshwater Microbiology*, 341–392. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817495-1.00009-8>
- Singh, H. B., Keswani, C., Reddy, M. S., Sansinenea, E., & García-Estrada, C. (Eds.). (2019). *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*. doi:10.1007/978-981-13-5862-3
- Singh, S., Kant, C., Yadav, R. K., Reddy, Y. P., & Abraham, G. (2019). Cyanobacterial Exopolysaccharides: Composition, Biosynthesis, and Biotechnological Applications. *Cyanobacteria*, 347–358. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814667-5.00017-9>
- Stirk, W. A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., ... van Staden, J. (2014). *Effect of light on growth and endogenous hormones in Chlorella minutissima (Trebouxiophyceae)*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 79, 66–76. doi:10.1016/j.plaphy.2014.03.005
- Tan, C. Y., Dodd, I. C., Chen, J. E., Phang, S. M., Chin, C. F., Yow, Y. Y., & Ratnayeke, S. (2021). Regulation of algal and cyanobacterial auxin production, physiology, and application in agriculture: an overview. *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 2995–3023. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02475-3>
- Tiwari, O. N., Mondal, A., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. K., Jaladi, P., Oinam, G., & Indrama, T. (2019). Purification, characterization and biotechnological potential of new exopolysaccharide polymers produced by cyanobacterium *Anabaena* sp. CCC 745. *Polymer*, 178, 121695. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.121695>
- Toribio, A., Suárez, E., Jurado, M., Lopez, M., & Lopez J. (2020). Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. *Informes de biotecnología. Biotechnol Rep (Amst)*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00449>
- Trabelsi, L., ben Ouada, H., Bacha, H., & Ghoul, M. (2008). Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the

- cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 405–412. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9383-8>
- Vásquez-Villalobos, V., Vergaray, D., Méndez, J., Barrios, I., Baquedano, R., Caldas, C., Cruz, J., Gamboa, J., & Rivera, I. (2017). Effect of the light emitting diodes intensity and photoperiod in the optimization of the *Spirulina* (*Arthrospira*) biomass production. *Scientia Agropecuaria*, 8, 43–55. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.04>
- Veerabhadhran, M., Chakraborty, S., Mitra, S., Karmakar, S., & Mukherjee, J. (2018b). Effects of flask configuration on biofilm growth and metabolites of intertidal Cyanobacteria isolated from a mangrove forest. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 190–202. <https://doi.org/10.1111/jam.13761>
- Wenz, J., Davis, J.G. & Storteboom, H. Influence of light on endogenous phytohormone concentrations of a nitrogen-fixing *Anabaena* sp. cyanobacterium culture in open raceways for use as fertilizer for horticultural crops. *J Appl Phycol* 31, 3371–3384 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01856-z>
- Yadav, A. N. (Ed.). (2021). *Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity*. doi:10.1007/978-3-030-73507-4
- You, T., & Barnett, S. M. (2004). Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*, 19(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.02.004>
- Zapata, D., Arroyave, C., Cardona, L., Aristizábal, A., Poschenrieder, C., & Llugany, M. (2021). Phytohormone production and morphology of *Spirulina platensis* grown in dairy wastewaters. *Algal Research*, 59, 102469. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102469>