

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Establecimiento de un método de extracción y detección de cianotoxinas a partir de cultivos de *Oscillatoria sp.* obtenidos en condiciones de estrés**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica


**Autores:**

Katherine Valeria Carchi Quezada

María José Moreno Lara

**Director:**

Fabián León Tamariz

ORCID:  0000-0003-1540-8087

**Cuenca, Ecuador**

2023-10-24

## Resumen

Las cianobacterias son organismos microscópicos que pueden desarrollarse en distintos medios, tanto acuosos como terrestres. Su presencia puede constituir un riesgo para otros organismos vivos cuando su reproducción es descontrolada, formando los denominados blooms o floraciones. Esta actividad se basa en su capacidad de producir sustancias, sobre todo nitrogenadas (péptidos o alcaloides) que se denominan cianotoxinas. El presente trabajo busca establecer parámetros generales para la extracción y determinación de cianotoxinas a partir de cultivos de *Oscillatoria* sp obtenidos bajo condiciones de estrés lumínico, exceso de nutrientes, y variación de pH. Los cultivos obtenidos en estas condiciones fueron comparados con cultivos producidos bajo condiciones estandarizadas. Se utilizó *Thalassiosira* sp. como especie de microalga o control negativo. Los extractos fueron obtenidos mediante tratamiento por micronización y ultrasonido. Luego fueron purificados mediante extracción de fase sólida, y posteriormente analizados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis de resultados no permite observar la presencia de cianotoxinas en las fracciones purificadas. Sin embargo, las limitaciones analíticas presentes en este trabajo no facilitan resultados concluyentes.

*Palabras clave:* cianobacterias, nitrógeno, fosforo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC)



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

Cyanobacteria are microscopic organisms that can grow up in different environments, both aqueous and terrestrial. Its presence can constitute a risk for other living organisms when its reproduction is uncontrolled, forming the so-called blooms. This activity is based on its ability to produce substances, especially nitrogenous (peptides or alkaloids) that are called cyanotoxins. The present work seeks to establish general parameters for the extraction and determination of cyanotoxins from *Oscillatoria* sp cultures obtained under conditions of light stress, excess nutrients, and pH variation. The cultures obtained under these conditions were compared with cultures produced under standardized conditions. *Thalassiosira* sp. as a species of microalgae or negative control. The extracts were obtained by treatment by micronization and ultrasound. They were then purified by solid phase extraction, and subsequently, analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The analysis of results does not allow observing the presence of cyanotoxins in the purified fractions. However, the analytical limitations present in this work do not provide conclusive results.

**Keywords:** cyanobacteria, nitrogen, phosphorus, high performance liquid chromatography, thin layer chromatography



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

Resumen	2
Abstract	3
Dedicatoria	4
Agradecimiento	6
Índice	7
1. INTRODUCCIÓN	10
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo general:	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MARCO TEÓRICO	14
4.1. Generalidades de las cianobacterias	14
4.1.1. Factores que influyen en la producción de cianotoxinas	14
4.1.1.1. Factores físicos	15
4.1.1.2. Factores químicos	16
4.1.2. Cianotoxinas	17
4.1.2.1. Citotoxinas	18
4.1.2.2. Neurotoxinas	18
4.1.2.3. Dermatotoxinas	18
4.1.2.4. Hepatotoxinas	18
4.1.2.4.1. Microcistina	19
4.1.3.	20
4.2. Métodos utilizados en análisis de cianobacterias	21
4.2.1. Medios de cultivo	21
4.2.2. Métodos de extracción	21
4.2.2.1. Micronización	21
4.2.2.2. Ultrasonido	21
4.2.3. Liofilización	22
4.2.4. Métodos de análisis y detección	22
4.2.4.1. Cromatografía en capa fina TLC	22
4.2.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Materiales, reactivos y equipos	23
5.2. Métodos	23
5.2.1. Etapa I: fase de cultivo	23
5.2.1.1. Cultivos de cianobacterias	23

5.2.1.2. Obtención de biomasa	24
5.2.1.3. Liofilización de biomasa	24
5.2.2. Etapa II: fase de extracción	24
5.2.2.1. Extracción por micronización	24
5.2.2.2. Extracción por ultrasonido	25
5.2.2.3. Concentración del extracto por rotavapor.	25
5.2.2.4. Liofilización del extracto.	25
5.2.2.5. Preparación del extracto.	25
5.2.3. Etapa III: fase de análisis	25
5.2.3.1. Análisis por HPLC:	25
5.2.3.2. Análisis mediante TLC	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1. Resultados	27
6.1.1. Evaluación del crecimiento de cianobacterias	27
6.1.2. Generación de biomasa de 27	
6.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC	27
6.1.4. Cromatografía en capa fina TLC	28
6.2. Discusión	30
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
7.1. Conclusiones	35
7.2. Recomendaciones	35
Referencias	36
Anexos	45

## Índice de figuras

Figura 1: Estructura de la microcistina (Pérez-Morales et al., 2016)	19
Figura 2: <i>Oscillatoria</i> sp. (M.I., 2014).	20
Figura 3: Cromatograma del blanco MeOH, MAAL 05, MAAL 60 N, MAAL 60 M a longitudes de onda de 235 y 240 nm	27
Figura 4: Posibles compuestos con estructuras fenólicas en los extractos en placa TLC a $\lambda$ 366 nm y 254 nm. Fuente Autoras	28
Figura 5: Compuestos nitrogenados de los extractos en placa TLC en luz visible. Revelador: solución de Ninhidrina. Fuente: Autoras	29
Figura 6: Posibles compuestos con estructuras fenólicas de los extractos en placa TLC bajo luz visible, revelador: vapores de Yodo Fuente: Autoras	29

**Dedicatoria**

A Dios, en quien encuentro fortaleza y guía en los momentos más difíciles y cuyas bendiciones han sido innumerables en mi vida.

A mis padres y familia, cuyo amor incondicional y apoyo constante han sido mi farol en este viaje. Cada uno de ustedes ha dejado una huella indeleble en mi vida.

A mis queridos hermanos, Fernando y Kevin, quienes han sido mí apoyo inquebrantable, mi fuente de inspiración y mi razón para perseverar. Este logro es tanto suyo como mío.

A mis amigos, compañeros de vida y estudios, que siempre han estado a mi lado compartiendo risas, desafíos y triunfos. Sus ánimos y sonrisas han iluminado cada etapa de este camino académico.

Esta investigación está dedicada a todos ustedes quienes han sido mi inspiración y mi razón para perseverar. Gracias por estar siempre a mi lado.

Katherine Carchi

**Dedicatoria**

La presente investigación, es el resultado del esfuerzo, sacrificio, dedicación y disciplina. Por lo que al concluir con éxito este importante capítulo de mi vida. Quiero dedicarles a mis padres, a mi hermana Hipatia, hermanos y amigos; Son ustedes que, con su confianza y apoyo incondicional, me motivaron para llegar a cumplir esta meta.

Cada paso que he dado ha sido una larga travesía académica, que iba encaminada hacia la búsqueda de nuevos conocimientos científicos mi gran deseo de superarme a mí mismo. Por ello mi compromiso hacia esa meta me ha hecho enfrentar a grandes desafíos y aprender de cada experiencia y seguir adelante incluso hasta en las condiciones más adversas.

Adicionalmente, extiendo a mis queridos amigos por ser una fuente constante de motivación a lo largo de esta etapa. Es por ello que cada reunión, cada plática y cada risa compartida se han convertido en bonitos recuerdos que me acompañaran siempre durante toda mi vida.

María José Moreno



### **Agradecimiento**

En primer lugar, nuestra gratitud va dirigida a Dios, por brindarnos salud, bienestar y sabiduría para culminar nuestros estudios.

A nuestros padres y familiares que nos brindan su amor incondicional.

Al Dr. Fabian León, nuestro asesor, por brindarnos su apoyo, su inquebrantable compromiso y su profundo conocimiento durante este periodo.

A su vez extendemos nuestro agradecimiento a la BQF. Jessica Calle, por su asesoría, disposición y compañía para la realización del presente trabajo de titulación.

A todos aquellos docentes que nos guiaron durante todo este proceso académico.

A todos nuestros amigos que estuvieron a lo largo del camino durante esta etapa de aprendizaje por motivarnos a mejorar constantemente

Kathe y Majo.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, existe un enriquecimiento de nutrientes, particularmente de fósforo y nitrógeno en los cuerpos de agua, que genera el aumento en la proliferación de cianobacterias, considerándose un problema ambiental. Algunos géneros y especies de estos microorganismos son capaces de liberar cianotoxinas, representando un grave peligro tanto para la salud humana como animal (Ren et al, 2023).

Las cianotoxinas, compuestos derivados de cianobacterias, son agrupados de acuerdo con su modo de acción y composición química. De acuerdo con el sitio de acción, se distinguen como hepatotóxicas, neurotóxicas, citotóxicas y dermatotóxicas. Por otro lado, en función de su estructura química, se pueden clasificar en alcaloides, péptidos cíclicos y lipopolisacáridos (Yan et al, 2023). La mayoría de las cianotoxinas residen intracelularmente. Sin embargo, ante la ruptura celular, estas toxinas se liberan al medio ambiente, lo que representa una amenaza para los grandes cuerpos de agua utilizados como fuente de agua potable, actividades recreativas entre otros propósitos (Belij et al, 2023). De todas las cianotoxinas existentes las microcistinas (MCs) son consideradas las más tóxicas. Estas se aislaron principalmente de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*; sin embargo, estudios posteriores determinaron que también puede ser producida por otros géneros, entre ellos *Oscillatoria* sp. (Merel et al, 2013).

Dada la amplia variedad de cianobacterias y la diversidad de hábitat en los que han evolucionado resulta difícil predecir todas las variables ambientales necesarias para el crecimiento y producción de toxinas por una especie en particular. Sin embargo, se han descrito los principales factores involucrados que son los nutrientes, intensidad lumínica y el pH. Además, cabe mencionar que la producción de microcistina guarda relación con la presencia de genes *mcy*, los cuales no se expresan en todas las de cianobacterias (Crettaz, 2018; Belij et al, 2023).

Por lo antes expuesto, es fundamental continuar investigando y estudiando la diversidad de estos microorganismos para comprender mejor su comportamiento y su impacto en los diferentes ecosistemas (Sanseverino et al., 2017).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El agua dulce ha experimentado un grave deterioro debido a la influencia de actividades humanas; tales como, la generación de desechos, residuos agrícolas y aguas residuales no tratadas adecuadamente. Estos factores han conducido a un aumento de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, en el fenómeno conocido como eutrofización (Paredes & Roldán, 2022; Rojas, 2021). La eutrofización es uno de los factores que contribuyen al aumento de la biomasa de cianobacterias en los ecosistemas acuáticos, lo que puede llevar a un crecimiento excesivo de estos microorganismos, conocidos como blooms o floraciones. Existen otros factores como la temperatura, el pH y la intensidad de la luz los cuales influyen en las floraciones (Dolman, et al.,2012).

Es importante destacar que las características de las floraciones varían según la especie de cianobacteria(s) que las componen, ya que no todas producen cianotoxinas. Por lo general, en la biomasa coexisten especies tóxicas y no tóxicas. La producción de metabolitos tóxicos está relacionada con la composición taxonómica de las cianobacterias, y depende de la activación del gen que produce la toxina en condiciones ambientales específicas. Además, una especie de cianobacteria puede producir diferentes toxinas, incluso, diversas cianotoxinas pueden ser generadas por distintas especies (Sanseverino et. Al., 2017).

Las cianotoxinas pertenecen al dominio Bacteria, aunque comparten características estructurales y funcionales con las bacterias heterótrofas y las algas respectivamente (Sánchez, 2020). Las cianotoxinas se encuentran en diversas fuentes de agua que está en contacto con los seres humanos, lo que puede llevar a la exposición directa a través de partes del cuerpo expuestas, como oídos, boca, ojos, o mucosas, por la ingesta accidental o inhalar agua (OMS, 1998; Gilroy et al.,2000).

Por lo antes expuesto, es necesario disponer de métodos que permitan evaluar la calidad del agua dulce proveniente de diversas fuentes, a fin de descartar o detectar la presencia de estos contaminantes tóxicos. El presente trabajo, pretende establecer un método de extracción y detección para cianotoxinas a partir del análisis de muestras sometidas a condiciones de cultivo normales y bajo estrés, tanto lumínico, como pH y nutrientes, asemejando las condiciones naturales que disparan la síntesis de cianotoxinas. Se

utilizará la cianobacteria *Oscillatoria sp.*, los métodos de extracción y detección serán los empleados para la microcistina, dado que es la toxina producida por varios géneros de cianobacterias y la más tóxica para el ser humano. Sin embargo, no es la única que puede ser generada por el género *Oscillatoria sp.*

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general:

- Establecer parámetros generales para la extracción y determinación de cianotoxinas a partir de cultivos de *Oscillatoria sp.* obtenidos bajo condiciones de estrés lumínico, exceso de nutrientes, y variación de pH.

### 3.2. Objetivos específicos

- Optimizar los niveles de estrés lumínico, exceso de nutrientes y pH propicios para la producción de cianotoxinas a escala de laboratorio.
- Desarrollar una metodología de extracción de cianotoxinas mediante solventes orgánicos.
- Implementar un método para la detección de cianotoxinas mediante HPLC.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Generalidades de las cianobacterias

Las cianobacterias son microorganismos procariotas Gram negativos que realizan la fotosíntesis oxigénica mediante la clorofila, la cual se encuentra contenida en tilacoides. Estos organismos presentan una amplia diversidad morfológica, pudiendo adoptar formas elipsoides, esféricas, cilíndricas, en forma de barril, discoides o cónicas. Pueden existir como células individuales, formar colonias o incluso estructuras filamentosas multicelulares. Su tamaño varía según el grupo al que pertenezcan, siendo las células esféricas unicelulares las más comunes, con diámetros que oscilan entre 0.2 y 100  $\mu\text{m}$ . Su método de reproducción es exclusivamente a través de la división celular (Chorus & Welker, 2021; Hiskia et al., 2020).

Estos organismos tienen una amplia tolerancia a diversas condiciones ambientales, encontrándose en una variedad de hábitats, como entornos marinos, terrestres, salobres y aguas dulces. Para su crecimiento requieren luz, agua y nutrientes. Sin embargo, su exigencia en estos factores no es estricta (Sinha, 2022).

La eutrofización de las fuentes de agua se refiere al aumento de nutrientes, especialmente de fósforo y nitrógeno, debido principalmente a la acción humana. Estos cambios pueden provocar un incremento en la proliferación de cianobacterias, generando un fenómeno conocido como floraciones o blooms. Las floraciones de cianobacterias representan un peligro para la calidad del agua, ya que pueden causar su opacidad, sofoco de la vegetación acuática y generación de compuestos que alteran el sabor y el olor de la misma, volviéndola no apta para el consumo humano o para otros usos (Wurtsbaugh et al., 2019). Fundamentalmente, esta toxicidad se debe a la producción de cianotoxinas, las cuales pueden afectar la salud de mamíferos, aves y seres humanos al ingerir el agua o estar en contacto con ella (Paerl et al., 2018).

La comprensión de la diversidad de formas, los hábitats donde se encuentran y los riesgos asociados a las floraciones de cianobacterias nos permite entender la importancia de monitorear y controlar estos microorganismos para proteger la calidad del agua y la salud de ecosistemas y comunidades humanas (Jorna, 2012).

#### 4.1.1. Factores que influyen en la producción de cianotoxinas

Se han investigado diversos parámetros ambientales relacionados con la producción y crecimiento de cianotoxinas, especialmente en cianobacterias productoras de microcistinas.

Entre los factores físicos frecuentemente estudiados, se encuentran la temperatura e intensidad lumínica. Por otro lado, en cuanto a los factores químicos de estrés ambiental, se han analizado el nitrógeno, fósforo y pH. Generalmente, estos factores de estrés ambiental favorecen la producción de cianotoxinas en un factor de hasta tres veces (Smith, F.M., 2012).

#### 4.1.1.1. Factores físicos

- **Temperatura:** es uno de los factores primordiales que influyen el crecimiento y metabolismo de las cianobacterias. Este hecho se atribuye en gran parte a que la mayoría de las reacciones enzimáticas que intervienen en la fotosíntesis y la respiración son dependiente de la temperatura (Walls et al, 2018). Varios estudios en los que se manipuló la temperatura revelaron que el contenido de cianotoxinas aumenta con la temperatura (Rapatala et al, 1997; Brutemark et al, 2015). El rango de temperatura en el que generalmente se obtiene una tasa de crecimiento máximo oscila entre 25 y 30 °C (Reynolds, 2006).
- **Intensidad lumínica:** para abordar este parámetro es preciso hacer hincapié en que la luz es un requisito indispensable para que las cianobacterias realicen fotosíntesis oxigénica y a su vez esta presenta un efecto directo en el crecimiento celular, diversos estudios han demostrado que la luz está relacionada de forma significativa, aunque no lineal con la producción de microcistina. La intensidad lumínica es un parámetro que influye en la actividad fotosintética y estudios revelaron que las células necesitan una fotosíntesis activa para producir toxinas (Kim et al, 2005). Un estudio publicado por (Jacob et al, 2009) sobre los ciclos de luz/oscuridad determinó que los ciclos 12:12 horas luz/oscuridad son los más propicios para el crecimiento del cultivo de cianobacterias ya que simulan al fotoperiodo solar. Además, el crecimiento celular resulta afectado a intensidades de luz muy elevadas debido a que existe un aumento de especies reactivas de oxígenos (ROS) provocando un daño en los fotosistemas dando como resultado una disminución en la producción de clorofila (Polyzois, 2022). “La relación que existe entre la producción de microcistinas por célula y la intensidad lumínica se caracteriza generalmente como una parábola hacia abajo. Desde intensidades de luz bajas hasta intensidades de luz media, se produce un incremento en la producción de microcistina por célula”. Se ha observado que la producción de microcistina alcanza su punto máximo en las células a intensidades de luz media. Estas intensidades varían de 25 a 70  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , según de la cepa y condiciones experimentales (Polyzois, 2022).
-

#### 4.1.1.2. Factores químicos

- **Nutrientes (Nitrógeno y fósforo):** el nitrógeno y fósforo son elementos indispensables para el metabolismo de las cianobacterias y la síntesis de microcistinas. El primero desempeña un papel fundamental en la síntesis de ácido desoxirribonucleico y proteínas celulares, mientras que el fósforo es esencial en la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) y su transformación en las células. Además, participa en reacciones enzimáticas del metabolismo celular. El nitrógeno no solo es esencial para el desarrollo, crecimiento y propagación de las cianobacterias, sino también un elemento principal de las moléculas de microcistinas. Es por ello que se considera el nitrógeno como un determinante en la producción de microcistina. Concentraciones excesivamente altas o bajas de nitrógeno comprometen tanto el crecimiento de estos microorganismos como la producción de MCs (Dai et al, 2016). El fósforo desempeña un rol fundamental en los procesos reproductivos y de crecimiento de las cianobacterias. Una vez que este elemento penetra en la célula, su asimilación es inmediata, lo que conlleva a una reducción de su concentración extracelular, llegando a un nivel estacionario. Estos microorganismos han desarrollado una estrategia de almacenamiento intracelular de fósforo, preservando así reservas para períodos de escasez ambiental. Estudios revelan que el aumento de estos compuestos, N y P, resulta en un incremento de la síntesis de microcistina en la especie *Microcystis aeruginosa* (Rosso & Giannuzzi, 2011).
- **pH:** Las cianobacterias tienen preferencia por hábitats con un pH neutro o ligeramente alcalino. El pH no solo influye en su desarrollo, sino también en la productividad de la biomasa y la composición química. A pesar de su habilidad para adaptarse a las fluctuaciones de pH, estas variaciones impactan la disponibilidad de nutrientes, desencadenando respuestas de estrés en estos microorganismos. Cuando el pH del entorno es bajo, el pH interno de la cianobacteria disminuye, resultando en una mayor demanda energética. Por otro lado, en un entorno de pH alto, la carga de las proteínas se ve alterada, provocando repulsiones electrostáticas e inestabilidad en la estructura. Sin embargo, aún no se han explorado en su totalidad todos los posibles efectos derivados de estas variaciones (Sinha, 2022).

La capacidad de las floraciones para producir cianotoxinas depende de su herencia genética, es decir, si la floración presenta alguna de las especies que tienen los genes para formar toxinas. A pesar de ello, aún se desconoce el mecanismo por el cual se activan estos genes. No obstante,



se ha asociado que dicha activación depende de combinaciones específicas de factores ambientales, los cuales han sido descritos previamente (Garstecki et al, 2023 & Smith, 2012).

Las microcistinas se sintetizan de manera no ribosómica por los dominios del enzima péptido sintasa no ribosómica (NRPS) y la policétido sintasa (PKS), codificados por el grupo de genes *myc*. El estudio genético reveló que un gran grupo de genes NRPS están implicados en la promoción de la biosíntesis de microcistina. Dado que existen modificaciones covalentes en los residuos de aminoácidos, los productos de NRPS presentan una variada estructura química, lo cual puede explicar la gran cantidad de variantes de la toxina descrita (Garstecki et al, 2023 & Smith, 2012).

#### 4.1.2. Cianotoxinas

Las cianotoxinas son metabolitos secundarios producidos por las cianobacterias que desempeñan un papel crucial en su crecimiento, desarrollo y reproducción. Además, generan otros compuestos cuya función aún no se conoce por completo. Entre estos metabolitos, algunos tienen aplicaciones beneficiosas para otros seres vivos, ya sea como antibióticos, antivirales, antiinflamatorios, insecticidas, anticancerígenos, inmunosupresores y herbicidas. Sin embargo, también se conocen sustancias tóxicas, denominadas cianotoxinas, las cuales representan un riesgo para la salud tanto de animales como de seres humanos (Hiskia et al., 2020).

Las cianotoxinas son motivo de preocupación en lo que respecta a la calidad del agua, ya que su concentración tiende a aumentar en condiciones ambientales desfavorables para los microorganismos, cuando las cianobacterias mueren, estas liberan toxinas al entorno acuático. Los seres humanos son particularmente susceptibles a estas toxinas, que pueden ingresar a su organismo a través de diversas vías de exposición, como el consumo de agua o alimentos contaminados, por actividades recreativas en aguas afectadas por floración de cianobacterias, como nadar, navegar o practicar deportes acuáticos (Hiskia et al., 2020; Mohamed et al., 2020).

Desde el punto de vista químico, las cianobacterias pueden clasificarse en péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos. No obstante, también se categorizan según el órgano específico que afectan. Los principales grupos de cianotoxinas incluyen las citotoxinas, dermatotoxinas, neurotoxinas y hepatotoxicidad (Pérez et al., 2008).

#### 4.1.2.1. Citotoxinas

Dentro de este grupo, se incluyen aeruginosina, ambigol, apratoxina y curacina, aunque el más prevalente es la cilindrospermopsina. Esta última es un alcaloide que ejerce su acción perjudicial en órganos como el hígado, corazón, pulmones y riñones. Estas toxinas presentan características termoestables, hidrofóbicas y resistencia a condiciones extremas tales como el pH y la luz solar (Jakubowska & Szelağ-Wasielewska, 2015).

#### 4.1.2.2. Neurotoxinas

En el grupo de las neurotoxinas, encontramos los alcaloides anatoxin-a, homotoxina-a y saxitoxina, los cuales presentan una toxicidad similar y afectan gravemente el sistema nervioso. Su mecanismo de acción consiste en obstaculizar el sistema de señalización neuromuscular, lo que puede conllevar a una parálisis de los músculos respiratorios provocando la muerte (Sinha, 2022).

#### 4.1.2.3. Dermatotoxinas

En este grupo se han reportado algunos lipopolisacáridos producidos por las cianobacterias. Son compuestos que forman parte de la estructura de la membrana de la pared celular externa de bacterias gramnegativas. Estas toxinas provocan reacciones alérgicas, vómitos, diarrea y en casos más graves, un choque anafiláctico en personas sensibles. A diferencia de otros grupos su toxicidad se debe al contacto con la piel o a través de las vías respiratorias, más que por ingestión (Hiskia et al., 2020).

#### 4.1.2.4. Hepatotoxinas

Son sustancias producidas por diversos géneros de cianobacterias como *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Anabaena*, entre otras. Las toxinas hepatotóxicas representan el grupo más común y peligroso. Se puede clasificar en tres tipos principales: microcistinas, nodularinas y cilindrospermopsinas (Sinha, 2022; Jakubowska & Szelağ-Wasielewska, 2015).

Estas sustancias al ser almacenadas en los tejidos de crustáceos, caracoles, bivalvos, cangrejos y peces, pueden además del daño generado por la ingesta directa del agua contaminada, desencadenar intoxicaciones alimentarias que producen daños hepáticos, trastornos intestinales y hemorragias internas, significando un riesgo significativo para la salud (Sinha, 2022).

#### 4.1.2.4.1. Microcistina

Las microcistinas (MC) son un grupo de cianotoxinas ampliamente investigadas debido a su alta toxicidad. Estos compuestos pueden ser producidos por diferentes géneros de cianobacterias incluyendo *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Hapalosiphon*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* y *Llimnothrix*. La primera vez que se aisló una microcistina fue en la especie *Microcystis aeruginosa* (Beasley, 2020).

Las microcistinas son heptapéptidos monocíclicos sintetizados por vía no ribosómica, y están compuestos por una secuencia específica de aminoácidos: D-alanina, aminoácido variable, ácido D eritro-β-metil aspártico (D-MeAsp), aminoácido variable, ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil deca-4,6-dienoico (Adda), ácido glutámico, N-metil dehidroalanina (Mdha) (D-Ala-X-D-MeAsp-Y-Adda-D-Glu-Mdha). La diversidad de microcistina se atribuye a las variaciones en estos dos aminoácidos, lo que resulta en distintas variantes de la toxina. Algunas de las variantes más comunes son la MC-LR, MC-RR Y MC-YR, que contienen leucina(L), arginina(R) o tirosina(Y), en la posición dos o cuatro (Malik et al., 2020). La función exacta de estas moléculas en las cianobacterias aún no se conoce con certeza. Sin embargo, diversos autores proponen teorías respecto a su posible rol. Algunos sugieren que podrían desempeñar un papel protector dentro de la célula, mientras que otros la vinculan con funciones de señalización y división celular. Además, existe la hipótesis de que podría funcionar como quelante de hierro a nivel intracelular (Lago, L. et al., 2015).

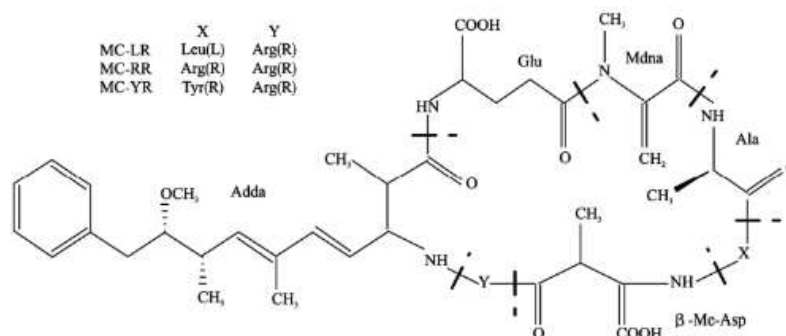


Figura 1: Estructura de la microcistina (Pérez-Morales et al., 2016)

Las microcistinas pueden afectar diversos órganos del ser humano entre ellos el hígado, riñones, intestino, cerebro, corazón, sistema reproductivo y pulmones. Sin embargo, su efecto más potente y tóxico se dirige principalmente hacia el hígado. Estas toxinas actúan inhibiendo la

actividad de las proteínas serina/treonina fosfatasa PP1 y PP2A, lo que provoca la acumulación de proteínas fosforiladas en el hígado. Como resultado se producen daños en las células hepáticas, lo que puede llevar a necrosis celular, hemorragia y, en casos muy graves, la muerte (Arman & Clarke, 2021).

#### 4.1.3. *Oscillatoria* sp.

La especie *Oscillatoria* sp. comprende cianobacterias filamentosas que pertenecen al filo *Cyanobacteria* de clase *Cyanophyceae*, orden *Oscillatoriales* y familia *Oscillatoraceae*. Sus células tienen forma cilíndrica, recta y son más cortas que anchas; el tamaño oscila entre 2-6  $\mu\text{m}$  de espesor y su longitud varía de 60 a 300  $\mu\text{m}$  (Nainangu et al., 2020; Adebayo-Tayo et al., 2019). Pueden poseer filamentos uniseriados y pueden presentar una disposición recta u ondulada, sin ramificaciones. Uno de sus extremos es apical cónica, mientras que el otro es basal truncado y a veces se encuentran enrollados. Además, estos filamentos presentan movilidad oscilante y temblorosa. En cuanto a la coloración, pueden variar desde verde azulado a parduzco o casi negro. No poseen esporas resistentes (Akinetes) ni células específicas para la fijación de nitrógeno (heterociste) (Nienaber & Steinitz, 2018; Nainangu et al., 2020).



Figura 2: *Oscillatoria* sp. (M.I., 2014).

Estas cianobacterias se adhieren a superficies duras (bentónicas) y se encuentran en aguas superficiales o litorales marinos. Tienen la capacidad de formar floraciones, lo cual puede representar un problema para la seguridad del agua potable, ya que pueden producir metabolitos tóxicos como la Anatoxina-a, microcistinas, aplysiatoxinas, saxitoxinas y lyngbyatoxina-a (Nienaber & Steinitz, 2018).

Las especies potencialmente productoras de cianotoxinas incluyen variedades como *Oscillatoria agardhii*, *O. limosa*, *O. rubescen*, *O. limnetica* y *O. tenuis*. Sin embargo, no se puede generalizar

que todas las especies de *Oscillatoria* posean el gen productor de cianotoxinas. Por ejemplo, se ha observado que *Oscillatoria brevis* y *O. pronceps* han manifestado floraciones, pero no presentan la producción de alguna toxina específica (Mohamed, 2016).

## **4.2. Métodos utilizados en análisis de cianobacterias**

### **4.2.1. Medios de cultivo**

El medio blue-green (BG-11) es ampliamente utilizado para el cultivo de diversas especies de cianobacterias, incluyendo *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Chroococcus*, entre otras. Este medio forma parte de los medios de cultivo empleados en cianobacterias de agua dulce, sistemas marinos y suelos. Su composición precisa y la presencia de nutrientes esenciales son fundamentales para el crecimiento y desarrollo adecuado de estas bacterias fotosintéticas en el laboratorio. Su composición se detalla en el Anexo B (Pandey et al., 2023).

### **4.2.2. Métodos de extracción**

#### **4.2.2.1. Micronización**

Es un proceso físico que tiene como objetivo la reducción del tamaño de las partículas, donde las células en suspensión se rompen debido a la colisión de las perlas, generalmente de vidrio, por procesos de compactación o fuerzas de cizallamiento. Este proceso provoca un aumento de la superficie de contacto, lo que favorece el proceso de extracción (Bender et al., 2019; Günerken et al., 2015).

Se ha observado que la técnica de micronización presenta un alto rendimiento y eficacia en la ruptura celular, y cuenta con las ventajas de controlar la temperatura, fácil aplicación, disponibilidad de equipos en el mercado lo que hace de esta técnica una opción atractiva (Günerken et al., 2015).

#### **4.2.2.2. Ultrasonido**

La extracción de componentes bioactivos mediante sonicación se destaca como un método sencillo y reproducible frente a otros métodos. Este proceso implica la aplicación de ultrasonido para romper la membrana celular mediante compresiones y expansiones de ondas longitudinales a través de un medio líquido (solvente) (Rojas et al., 2019).

Estas ondas causan el fenómeno de cavitación, caracterizado por la formación de burbujas que colapsan en la superficie de las células, liberando los componentes bioactivos. Además, el

calentamiento del medio aumenta la difusión del extracto, mejorando así la transferencia de masa a través de la interfaz sólido-líquido. Los efectos mecánicos de la sonicación también promueven una mayor disolución del solvente en las paredes y membranas celulares, facilitando la liberación del contenido de las células y mejorando la transferencia de masa (Méndez, 2022; Ramón & Garzón, 2021).

#### **4.2.3. Liofilización**

La liofilización es un proceso de secado ampliamente empleado en las industrias de alimentos, farmacéutica y biotecnológica, con el propósito de estabilizar y conservar productos, reduciendo la pérdida de compuestos de interés. Es un proceso en el cual el agua presente en la estructura es sublimada gracias al empleo de vacío y un descenso de temperatura. El primer paso es una congelación del material de interés, seguida de la sublimación del hielo a presión subatmosférica. La liofilización ha permitido obtener productos de mayor calidad, sin embargo, requiere altos costos de operación, mantenimiento y presenta un alto consumo de energía. Además, una velocidad de congelación y presiones de vacío inadecuadas durante el ciclo de liofilización son responsables de un producto de mala calidad (Cortés et al., 2015).

#### **4.2.4. Métodos de análisis y detección**

##### **4.2.4.1. Cromatografía en capa fina TLC**

La cromatografía en capa fina (TLC) emerge como un método altamente accesible y sencillo de emplear, ya que no exige la utilización de instrumentación especializada. En el caso de las microcistinas se utiliza este procedimiento en situaciones en las que la concentración de microcistinas es relativamente baja. Para el caso de estas toxinas se puede emplear diferentes combinaciones de fases móviles como la mezcla de cloroformo, metanol y agua, o la combinación de acetato de etilo, isopropanol y agua (Watanabe et al., 1995; Meriluoto et al., 2000).

##### **4.2.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con UV es una técnica óptima para la detección de cianotoxinas debido a que ayuda a la separación de otros compuestos que puedan provocar interferencia por tener un espectro de absorbancia similar. Es la técnica más utilizada para la detección de microcistinas. Se utiliza un rango de absorción UV entre 200 y 300 nm. Estas cianotoxinas se separan al utilizar fases móviles de elución gradiente (Sanseverino et al., 2017).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales, reactivos y equipos

Véase en el anexo A.

### 5.2. Métodos

#### 5.2.1. Etapa I: fase de cultivo

##### 5.2.1.1. Cultivos de cianobacterias

Las especies *Microcystis aureginosa*, *Hapalosiphon* sp. y *Oscillatoria* sp., fueron obtenidas del cepario del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias.

Los cultivos se llevaron a cabo utilizando los medios de cultivo en condiciones normales y modificados (BG11-N Y BG11-M) para *Oscillatoria* sp, (codificada como **MAAL 60**) los cuales están descritos en el Anexo B. Se utilizaron frascos de vidrio de dos litros de capacidad previamente esterilizados y cerrados. Para garantizar la aireación adecuada de cada cultivo, se implementó una línea de aire por cada frasco. Se regularon dos periodos de luz-oscuridad, según el cultivo desarrollado. Para los frascos cultivados bajo condiciones normales en medio BG-11, se reguló ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas durante 14 días, aireación constante, temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , bajo una intensidad de luz a 820 y 1 500 lux, pH 7,85. En el caso de la biomasa de *Oscillatoria* sp. obtenida bajo condiciones de estrés, estas fueron establecidas de la siguiente manera: ciclo de luz-oscuridad de 18:6 horas durante 8 días y aireación constante, temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , bajo una intensidad de luz a 2100 lux y pH 9, según PNT OG 006.

La *Thalassiosira* sp., es un género de microalga que se desarrolla en medio de cultivo 2/F de Guillard, enriquecido con fósforo, silicio y nitratos, Además contiene vitaminas y trazas de metales. En el presente estudio se empleó dicha microalga obtenida del cepario del Grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del Departamento de Biociencias como control negativo frente al posible género

productor de cianotoxinas objeto de estudio. Se codificó a esta especie como **MAAL 5**.

#### **5.2.1.2. Obtención de biomasa**

Después del periodo de crecimiento de las cianobacterias, se inició la recolección de biomasa mediante centrifugación durante 5 min a 1500 rpm. Posteriormente, el sobrenadante fue separado por decantación. Al finalizar esta etapa, se llevaron a cabo tres ciclos de lavado para eliminar residuos del medio del cultivo y la biomasa se almacenó en tubos Falcon previamente etiquetados y pesados.

#### **5.2.1.3. Liofilización de biomasa**

Se colocó un volumen de 20 ml de biomasa en los tubos del liofilizador y se procedió a congelar la misma por un período de 3 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Biofreezer. Luego de este período, se procedió a colocar los tubos en el liofilizador por 24 horas, previamente adecuado a una temperatura de  $-51^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0.300 mBar. Al cabo de este tiempo fueron pesadas y almacenadas en tubos con tapa rosca a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar la rehidratación según PNT OG 006.

### **5.2.2. Etapa II: fase de extracción**

#### **5.2.2.1. Extracción por micronización**

Dado que las cianotoxinas son productos intracelulares, se realizó la micronización de las muestras, para ello se empleó beads de vidrio de  $0,1\ \mu\text{m}$  de diámetro y se adicionó la biomasa liofilizada conjuntamente con el solvente de extracción (metanol:agua en una proporción 75:25 v/v) en el frasco. Dicho frasco se ajusta al motor del equipo, quedando un espacio en el cual se añaden cubos de hielo con agua para evitar la elevación de la temperatura durante los ciclos de funcionamiento. Para el caso de *Thalassiosira* sp., se realizó un ciclo de 2 min 30 segundos de micronizado y 5 min de descanso, repitiendo el proceso hasta completar tres ciclos. En el caso de *Oscillatoria* sp., se realizó un ciclo de 5 min de micronizado y 5 min de descanso, repitiendo el proceso hasta completar tres ciclos, según PNT OG 014.



### **5.2.2.2. Extracción por ultrasonido**

Para la extracción mediante ultrasonido, se colocó un volumen de 50 ml de biomasa previamente micronizada con el solvente (metanol:agua en una proporción 75:25 v/v) en un balón de 500 ml. La extracción se realizó aplicando 1 ciclo modificado de una hora y media, a 35°C para cada muestra. Una vez transcurridos los períodos de tiempo de cada ciclo, la muestra fue concentrada al vacío en el rotavapor, según el PNT-FUN 007.

### **5.2.2.3. Concentración del extracto por rotavapor.**

El solvente utilizado para la extracción fue eliminado mediante el rotavapor a una temperatura de 30°C y 1500 rpm. Una vez que se ha logrado concentrar el extracto, este es llevado a una proporción de 80:20 v/v de agua:metanol para ser liofilizado y conservado. Este proceso se realizó según PNT-FUN 012.

### **5.2.2.4. Liofilización del extracto.**

Véase en el apartado 5.2.1.3. Liofilizado de biomasa de la etapa I: fase de cultivo.

### **5.2.2.5. Preparación del extracto.**

Se emplearon 50 mg de extracto seco de cultivo en BG11 N, BG11-M de MAAL 60 y MAAL 5 como control negativo, cada uno en su respectivo vial. A cada muestra se le añadió 0,5 ml ácido acético al 5% en agua y se sometió a baño maría con ultrasonido durante 10 min. Posteriormente, el extracto diluido se incorporó en un cartucho de extracción de fase sólida para purificación de la muestra, previamente adecuado mediante lavado con una solución de ácido acético al 0,1% en agua. Se llevaron a cabo dos lavados simultáneos con 10 ml de soluciones al 10% y 20% de metanol en agua. Finalmente, las fracciones que deberían contener las cianotoxinas fueron eluidas empleando 10 ml de una solución de metanol con 0,1% de ácido acético. El filtrado obtenido se concentró bajo una corriente de N<sub>2</sub> y fue conservado a -20°C hasta su próximo análisis.

## **5.2.3. Etapa III: fase de análisis**

### **5.2.3.1. Análisis por HPLC:**

Se analizaron tres muestras a una concentración de 1mg/ml en metanol grado HPLC, siendo el control negativo MAAL 5 (*Thalassiosira* sp.) y los extractos de cianobacterias MAAL 60 en condiciones de cultivo normales y modificadas (BG11-N y BG11-M).

Este análisis se llevó a cabo con el equipo HPLC equipado con un detector de arreglo de diodos, horno de columna e inyector automático. Se utilizó una columna Nucleosil 100-5 C18, equipada con una pre-columna. La temperatura de trabajo fue de 40 °C y la fase móvil consistió en una mezcla de agua con 0,1% de ácido acético (Solvente A) y acetonitrilo con 0,1% de ácido acético (Solvente B), en una gradiente de: 0 min (70% de A y 30% de B), 10 min (65 % de A y 35% de B), 40 min (30% de A y 70% de B ), 45 min (30% de A y 70% de B), 55 min (0% de A y 100% de B), 57 min (0% de A y 100% de B), 80 min (70% de A y 30% de B) y 95 min (70% de A y 30% de B). El flujo se reguló a 1ml/min y se emplearon longitudes de onda de 220, 225, 230, 235 y 240 nm para la detección de las posibles cianotoxinas, según PNT-FUN-014 (Anexo C).

#### 5.2.3.2. Análisis mediante TLC

La etapa descrita a continuación se llevó a cabo según el PNT-OG 015 Y PNT-FUN 013.

- **Preparación de placas de TLC:** Se activaron las placas de TLC de Sílica gel 60 F254 con base de vidrio 10x10 cm en una estufa a 100 °C durante 60 min. Se procedió a sembrar sobre la línea base, soluciones de 5 mg/ml correspondientes a las fracciones de lavado (metanol al 10% y 20% en agua), y los compuestos purificados mediante extracción de fase sólida. Se utilizaron dos fases móviles para la elución de la muestra. La primera consistió en cloroformo:metanol:agua 65:35:10, v:v:v; y la segunda compuesta por acetato de etilo :isopropanol:agua 4:3:7, v:v:v.

Las placas fueron observadas bajo longitudes de onda corta y larga ( $\lambda$  254, 365 nm y luz visible) utilizando un equipo visualizador de TLC previo y posterior al revelado de las placas utilizando vapores de I<sub>2</sub>, y el revelador de Ninhidrina.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Resultados

#### 6.1.1. Evaluación del crecimiento de cianobacterias

En el presente estudio, de las tres especies cultivadas (*Microcystis aureginosa*, *Oscillatoria* sp. y *Hapalosiphon* sp.), *Oscillatoria* sp., fue la que presentó el crecimiento adecuado durante el período de estudio.

#### 6.1.2. Generación de biomasa de *Oscillatoria* sp

El rendimiento de la biomasa obtenida de *Oscillatoria* sp., cultivada en BG11-N fue 44,52g de biomasa húmeda, de la cual se obtuvieron 0,15 g de biomasa liofilizada. Por otro lado, para el cultivo en BG11-M se obtuvieron 0,3 g de biomasa liofilizada por cada 44,14 g de biomasa húmeda.

#### 6.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

Los resultados del análisis por HPLC se presentan a continuación.

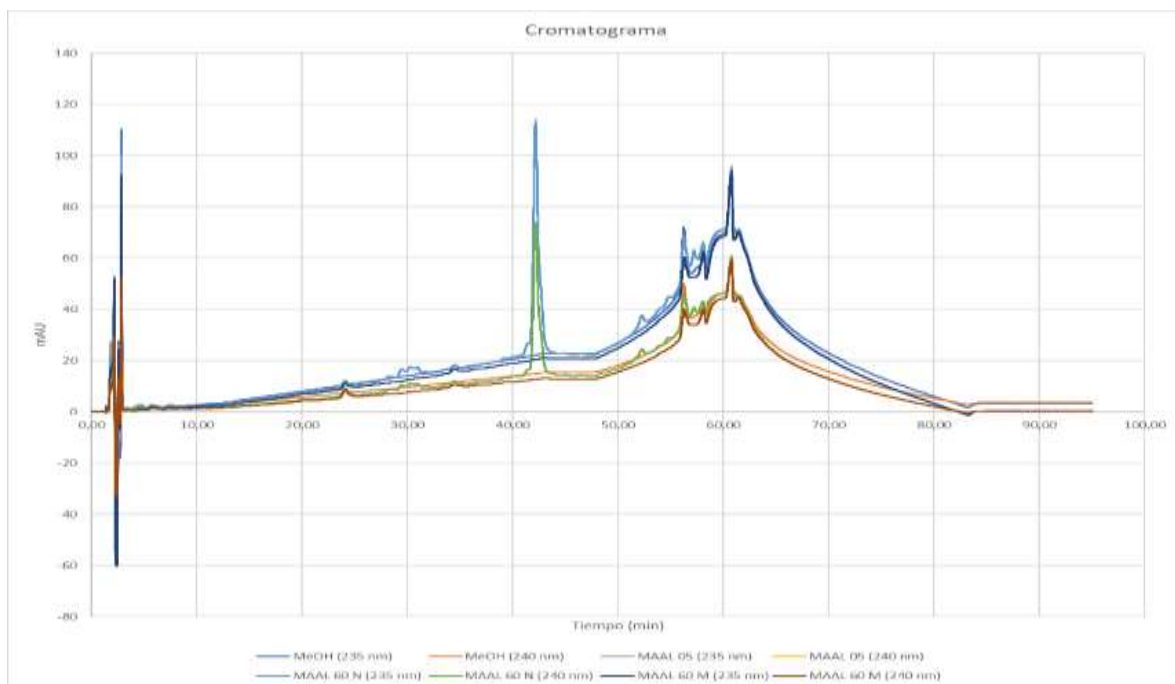


Figura 3: Cromatograma del blanco MeOH, MAAL 05, MAAL 60 N, MAAL 60 M a longitudes de onda de 235 y 240 nm

Después de realizar el análisis de los cromatogramas obtenidos, se puede observar que no hay presencia de picos en un tiempo de retención de 15 min que es el tiempo teórico establecido para la detección de microcistina. Luego de este tiempo se observan algunos picos que no podemos afirmar o negar que puedan ser otro tipo de cianotoxina ya que no disponemos de patrones. Se utilizó un amplio rango de longitudes de onda que va desde 220, 225, 230, 235 y 240 nm, con el objetivo de detectar el metabolito de interés. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados.

#### 6.1.4. Cromatografía en capa fina TLC

Los resultados del revelado de las placas de TLC se presentan en las Figuras 4, 5 y 6. Como se puede observar, al ser evaluadas bajo luz UV de onda corta y onda larga, las tres muestras presentan manchas cromatográficas de una coloración azul intensa con un Rf de 0.09; 0.12; y 0.65, probablemente correspondientes a estructuras de tipo fenólico. Mientras que a la exposición de 254nm, obtenemos Rf de 0,13 y 0,44 en las 3 muestras del primer lavado a 10% metanol. Debemos considerar que la estructura de las cianotoxinas puede implicar la presencia de péptidos, o de sustancias nitrogenadas del tipo alcaloides.

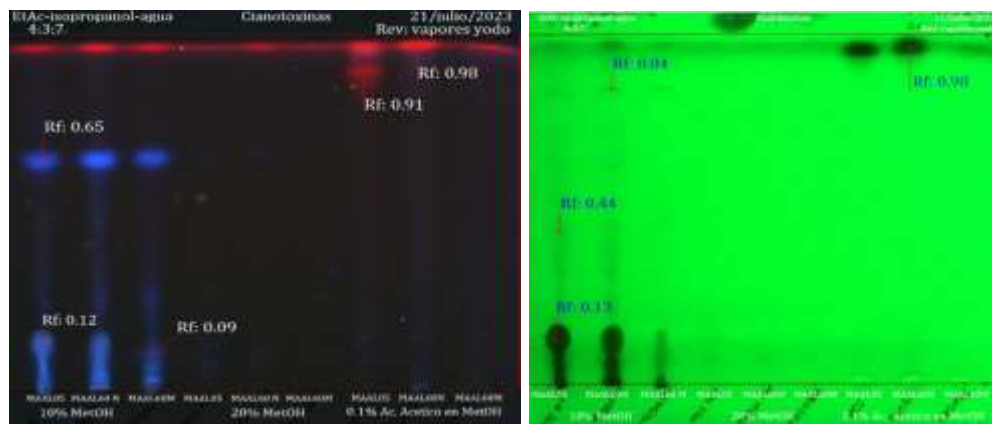


Figura 4: Posibles compuestos con estructuras fenólicas en los extractos en placa TLC a  $\lambda$  366 nm y 254 nm. Fuente Autoras

Para evaluar la posible presencia de estas sustancias, las placas cromatográficas fueron reveladas tanto con vapores de yodo, como con solución ácida de Ninhidrina. Los vapores de yodo se fijan sobre las insaturaciones, presentando manchas de una coloración amarillo-intensa. El revelador de Ninhidrina tiene la capacidad de detectar la presencia de grupos amino libres, o mono sustituidos desarrollando una coloración rosada o violeta.



## 6.2. Discusión

Inicialmente, se intentó cultivar las especies *Microcystis aureginosa* y *Hapalosiphon sp.*, cianobacterias conocidas como productoras de microcistinas, siendo estas, las causantes de la mayoría de las floraciones tóxicas alrededor del mundo (Almanza et al, 2016; Mendoza, 2016). Sin embargo, no se logró el desarrollo de estas especies en el laboratorio. Este hecho puede atribuirse a su preferencia por temperaturas cálidas, comunes en áreas tropicales, así como su óptimo crecimiento a un pH de 11 en cultivos de laboratorio (Carvajal, 2012 & Nasr et al, 2012). Investigaciones realizadas por (Pandey et al, 2023) informan que un alto nivel de iluminación (3000 lux) y una agitación de 150 rpm son requeridas para el crecimiento exitoso de dichas especies en el medio de BG11. Estas variables no pudieron ser probadas debido a limitaciones de tiempo. Como resultado, se optó por sustituir al microorganismo de estudio por el género *Oscillatoria sp.*, que también es reconocido como productor de microcistinas (Salomón et al, 2019).

En un estudio realizado por Wiedner et al. (2003), en el cual analizaron el efecto de la luz sobre el contenido de microcistina de la cepa *Microcystis* PCC 7806, se encontró que las concentraciones de microcistina a 2960 lux fueron de 16,73 µg/L, lo que es 20 veces mayor que a 740 lux, donde se obtuvo una concentración de 0,83 µg/L. Esto sugiere que la intensidad lumínica presenta un efecto positivo sobre la producción de microcistina, pero cantidades muy intensas de luz pueden inhibir la biosíntesis de la cianotoxina. En comparación con nuestro estudio, donde se analizaron intervalos de 820, 1500 y 2100 lux, no se logró obtener concentraciones de microcistina. Esto podría deberse a una falta de intensidad lumínica suficiente para que la cianobacteria sintetice una cantidad considerable de la toxina. Aunque nuestra cianobacteria es diferente a las del estudio de referencia, Rapala et al. (1997) sugiere que la relación entre la intensidad lumínica y la producción de cianotoxinas puede ser comparada con estudios previos con otros géneros de cianobacterias tóxicas.

La disponibilidad del nitrógeno desempeña un papel primordial en el desarrollo de las cianobacterias, pero la interpretación de su influencia en la formación de microcistina presenta divergencias en diferentes estudios. Boopathi y Ki (2014) destacan que, en cianobacterias unicelulares no fijadoras de nitrógeno, un aumento de nitrógeno en el medio resulta en una mayor producción de microcistinas. Sin embargo, esto se contrapone a los hallazgos de Sevilla y colaboradores, cuyo trabajo revela que, en el caso de la especie *M. aeruginosa*, un aumento en

los niveles de nitrógeno sólo incide en la aceleración de la tasa de crecimiento, sin mediar un incremento en la producción de la toxina (Boopathi & Ki, 2014; Sevilla et al., 2010).

Otra perspectiva a considerar, presentado por Chaffin y su equipo (2018), es que concentraciones mayores de 0,2 mg/l de N y alta intensidad de luz de 16 200 lux induce una mayor expresión de los genes *mcy* en las especies *Microcystis* y *Planktothrix*, lo que conlleva a una amplificación en la concentración de microcistinas. Comparando los factores mencionados con los de nuestro estudio, proporcionamos altas cantidades de nitrógeno (3000 mg/l); sin embargo, la intensidad luminosa (2 100 lux) puede no haber sido suficiente, lo que podría ser una causa de que no se evidenció la presencia de MC. Esto nos lleva a especular que la activación de los genes *mcy* no se estimuló adecuadamente debido a la falta de intensidad lumínica o a la ausencia de los genes *mcy*.

Según el análisis de Kuniyoshi et al. (2013), cantidades altas de fósforo (348 mg/l) genera un pequeño aumento en la tasa de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* PCC7806 y disminuyen la expresión del gen *mcyD*. Por otro lado, concentraciones de 8 mg/l generan una mayor producción de microcistinas. Sin embargo, en el presente estudio no se pudo apreciar este resultado.

En 1990, Sivonen llevó a cabo un estudio titulado "Efectos de la luz, la temperatura, el nitrato, el ortofosfato y las bacterias en el crecimiento y la producción de hepatotóxicas por cepas de *Oscillatoria agardhii*". En este estudio, se examinaron cepas de *Oscillatoria agardhii* obtenidas de cuatro zonas distintas en Finlandia, una de las cuales no producía cianotoxinas. Los resultados revelaron que la cepa de cianobacteria no productora de toxinas no mostró cambios significativos en su crecimiento y producción de hepatotóxicas cuando se sometió a diferentes condiciones, incluyendo temperaturas que variaron entre 15 y 25 °C, concentraciones elevadas de nitrógeno (0,42 a 84 mg/l), fósforo (0,1 a 0,4 mg/l), exposición lumínica (de 888 a 7030 lux) y competencia con otros microorganismos.

Por otro lado, tres de las cepas que ya producían hepatotóxicas mostraron resultados distintos. Se observó una mayor producción de cianotoxinas en las cepas cultivadas en condiciones axénicas. Además, se encontró que el alto contenido de microcistinas estaba relacionado con mayores concentraciones de nitrógeno (84 mg/l) y una intensidad lumínica baja (888 lux). En contraste, concentraciones bajas de fósforo (0,1 mg/l), resultaron en altas concentraciones de

toxinas. Finalmente, se determinó que la temperatura óptima para la producción de microcistinas fue de 25°C.

En otro análisis, Srivastava et al. (2016) investigaron el efecto de los factores ambientales en la producción de microcistinas utilizando dos cepas de *Microcystis aeruginosa*. La primera cepa se cultivó en condiciones normales en el medio BG-11, mientras que la segunda cepa, se sometió a un medio BG-11 modificado con aumento de N (21000 a 246000 mg/l), P (30000 a 712000 mg/l) y B (0,002 a 0,4mg/l); intensidad de luz de 5920 lux, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclos de luz-oscuridad de 18:6 h y pH 8.5. El resultado fue un aumento en la producción de microcistinas en la segunda cepa en comparación con la primera, lo que demuestra que los factores ambientales pueden generar un aumento en la toxina en esta especie.

Comparando estos estudios con nuestra investigación, donde se analizaron variaciones en luminosidad, pH y mayor concentración de nitrógeno y fósforo en una especie de *Oscillatoria sp.* desconocida, encontramos similitudes en los parámetros y diferencias en los resultados. En los casos de Srivastava et al. y Sivonen, la presencia de nutrientes y las condiciones ambientales influyen en la producción de hepatotóxicas. Sin embargo, a pesar de las similitudes, nuestro estudio no logró detectar la generación de la toxina conocida como "Microcistina", que es el foco de nuestro análisis. Esto puede atribuirse a múltiples variables, como diferencias en la especie de cianobacteria, las variaciones adicionales en el medio de cultivo y las condiciones de experimentación.

El estudio llevado a cabo por Dolman y su equipo (2012), demuestra la necesidad de evitar generalizaciones al examinar las respuestas de las cianobacterias ante incrementos en los niveles de nitrógeno y fósforo. En este contexto, se destaca la importancia de considerar a cada especie por separado, dado que las cianobacterias constituyen un conjunto de organismos heterogéneos que reaccionarán de manera diversa a estos cambios ambientales (Dolman et al., 2012). Es probable que nuestro estudio guarde relación con la investigación realizada por este autor, lo que podría ayudarnos a comprender por qué *Oscillatoria sp.*, mostró un comportamiento diferente.

A través de una investigación de *Microcystis viridis*, Song et al. (1998), se concluyó que la intensidad luminosa (1 110 lux) está relacionada con la temperatura de 25°C para la producción de microcistinas. Además, descubrieron que en pH neutro y alcalino (7 y 9,2) mejora el rendimiento de microcistinas. Comparando estos parámetros con los utilizados en nuestro



estudio, son semejantes, pero no con la especie. Esto refuerza lo que menciona Kruskopf & Plessis de que las diferentes especies no actúan de la misma manera ante los mismos factores. Sin embargo, el pH es un factor que se debe tomar en cuenta ya que de este dependerá qué sustancias pueden ser absorbidas por la célula. Por lo que Huang et al. (2019) recomiendan que “El valor del pH no debe ser ignorado a la hora de evaluar el riesgo de las sustancias químicas que promueven la producción de MC-LR en aguas eutróficas”.

Estudios realizados por (Hou Wei et al.,2020; Walls et al.,2018) señalan que, aunque el mecanismo por el cual las cianobacterias producen cianotoxinas aún no ha sido completamente dilucidado, se ha asociado que su detección depende de la presencia de genes *mcy* y, a su vez, de su activación mediante los factores ambientales a los cuales las cianobacterias han estado expuestas.

Investigaciones realizadas por Bittencourt, Santos & Moura (2010) informan la presencia de fragmentos amplificados de los genes *mcy* en sus muestras de investigación, pero no se detectó microcistinas mediante cromatografía líquida de alta resolución. Este hecho podría estar relacionado con la falta de activación de los genotipos productores de microcistina, o con la posibilidad de que la cianotoxina se encuentre presente en una concentración inferior al límite de detección del HPLC. Estos hallazgos se alinean con trabajos previos realizados por Bittencourt, (2002) y Kurmayer & Kutzenberger (2003). A raíz de lo expuesto anteriormente, especulamos que los resultados de nuestra investigación también podrían deberse a la falta de los genes *mcy* en la especie de estudio o una cantidad indetectable de MCs.

En este trabajo, se utilizó el método de TLC para visualizar los componentes de los lavados y la elución con ácido acético al 0,1% en metanol de las muestras. Con el objetivo de identificar posibles compuestos nitrogenados que forman parte de las estructuras de las cianotoxinas y que podrían haber quedado retenidos en los lavados. Dado que las cianotoxinas pueden contener péptidos o sustancias nitrogenadas, como alcaloides, en su estructura, resulta útil emplear la cromatografía en capa fina para observar la presencia de estos compuestos, además de otros cianocompuestos (Meriluoto et al, 2001). Estos microorganismos poseen componentes proteicos y producen una variedad de metabolitos secundarios, incluyendo compuestos fenólicos, que exhiben una gama de colores bajo la exposición a la luz UV, como el color azul (Guerreiro, 2020; Callejas, 2007 & Vargas, 2020).

Finalmente, en investigaciones actuales existen otros factores que no fueron considerados en este estudio, pero que poco a poco están tomando mayor relevancia en la producción de microcistinas. Entre estos factores se encuentra el control de hierro (Alexova et al., 2011), la temperatura (Melina Celeste et al., 2017), la concentración de aminoácidos en el medio ambiente (Dai et al., 2009), las concentraciones de CO<sub>2</sub> y su relación con el pH (Yu et al., 2015), estrés por dióxido de titanio (Zhang et al., 2020) y el estrés por níquel (Martínez & Martínez, 2016), entre otros. Lo que se debe tener en cuenta es que, debido a la gran diversidad de cianobacterias, resulta complicado estandarizar factores de estrés que aseguren la producción de microcistinas.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1. Conclusiones

Tras finalizar la investigación, se llegó a la conclusión de que existen tres posibles causas para la falta de producción de cianotoxinas en la especie *Oscillatoria* sp. En primer lugar, es posible que la cianobacteria de estudio no posea el gen para la producción de cianotoxinas. En segundo lugar, es probable que los niveles de estrés lumínico, exceso de nutrientes y pH aplicados pueden no ser suficientes para favorecer la producción de estas sustancias tóxicas. Tercero, los factores empleados en cultivo podrían no ser los únicos que generen condiciones de estrés en el cultivo. Como resultado no se logró detectar la presencia de cianotoxinas mediante cromatografía líquida de alta resolución.

### 7.2. Recomendaciones

- Incorporar patrones de cianotoxinas ya que son fundamentales para comprender el comportamiento de estas sustancias frente a los procesos extractivos y de cultivos.
- Revisar la posibilidad de desarrollar cultivos compartidos con varias especies de cianobacterias y microalgas para evaluar la posible respuesta de cianobacterias a través de la producción de cianotoxinas al competir por recursos limitados.
- Incluir estudios moleculares, que permitan determinar si las cepas de estudio presentan los genes productores de cianotoxinas y a su vez añadir otros factores ambientales que produzcan estrés a los cultivos de laboratorio.

### Referencias

- Abdallah, M. F., Van Hassel, W. H. R., Andjelkovic, M., Wilmotte, A., & Rajkovic, A. (2021). Cyanotoxins and Food Contamination in Developing Countries: Review of Their Types, Toxicity, Analysis, Occurrence and Mitigation Strategies. *Toxins*, 13(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/toxins13110786>
- Adebayo-Tayo, B., Salaam, A., & Ajibade, A. (2019). Green synthesis of silver nanoparticle using *Oscillatoria* sp. Extract, its antibacterial, antibiofilm potential and cytotoxicity activity. *Heliyon*, 5(10), e02502. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02502>
- Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T. D., Ferrari, B. C., & Neilan, B. A. (2011). Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environmental Microbiology*, 13(4), 1064-1077. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02412.x>
- Almanza, V., Parra, O., De M. Bicudo, C. E., Baeza, C., Beltran, J., Figueroa, R., Urrutia, R (2016). Occurrence of toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in a central Chilean (36° Lat. S) urban lake. *Revista Chilena de Historia Natural*. 89 (1): 8. Doi: 10.1186/s40693-016-0057-7
- Arman, T., & Clarke, J. D. (2021). Microcystin Toxicokinetics, Molecular Toxicology, and Pathophysiology in Preclinical Rodent Models and Humans. *Toxins*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/toxins13080537>
- Beasley, V. R. (2020). Harmful Algal Blooms (Phycotoxins). En Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences (p. B9780124095489112000). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11275-8>
- Bender, A. B. B., Goulart, F. R., Silva, L. P. da, & Penna, N. G. (2019). Micronization and extrusion processing on the physicochemical properties of dietary fiber. *Ciência Rural*, 49(7). doi:10.1590/0103-8478cr20190154Garstecki, Bernadel, and Scott Wells. 2023. "Modeling Cyanotoxin Production, Fate, and Transport in Surface Water Bodies Using CE-QUAL-W2" *Environments* 10, no. 7: 122. <https://doi.org/10.3390/environments10070122>

- Boopathi, T., & Ki, J.-S. (2014). Impact of Environmental Factors on the Regulation of Cyanotoxin Production. *Toxins*, 6(7), 1951-1978. <https://doi.org/10.3390/toxins6071951>
- Callejas, M. (2007). Trabajo esoecial I: Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias formadoras de heterocistos. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19143/1/uy24-12246.pdf>
- Carvajal, G. (2011). OCCURRENCIA DE FLORACIONES DE CYANOBACTERIAS TOXICAS EN CUERPOS DE AGUA DULCE, ARGENTINA. ESTUDIO DE CAMPO Y ANALISIS DE DATOS. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2702/Documento\\_completo.pdf%3Fsequence%3D1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2702/Documento_completo.pdf%3Fsequence%3D1)
- Chaffin, J. D., Davis, T. W., Smith, D. J., Baer, M. M., & Dick, G. J. (2018). Interactions between nitrogen form, loading rate, and light intensity on Microcystis and Planktothrix growth and microcystin production. *Harmful Algae*, 73, 84-97. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.02.001>
- Chorus, I., & Welker, M. (Eds.). (2021). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>
- Cortés R, M., Herrera H, E., & Rodríguez S, E. (2015). OPTIMIZACIÓN EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE UCHUVA ADICIONADA CON COMPONENTES ACTIVOS POR IMPREGNACIÓN AL VACÍO. *Vitae*, 22(1), 47-56. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v22n1a06>
- Dai, R., Liu, H., Qu, J., Zhao, X., & Hou, Y. (2009). Effects of amino acids on microcystin production of the *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2), 730-736. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.015>
- Dai, R., Wang, P., Jia, P., Zhang, Y., Chu, X. y Wang, Y. (2016). *Una revisión de los factores que afectan la producción de microcistinas por algas en ambientes acuáticos*. *Revista mundial de microbiología y biotecnología*, 32(3). doi:10.1007/s11274-015-2003-2
- Dolman, A. M., Rücker, J., Pick, F. R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., & Wiedner, C. (2012). Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *PLoS ONE*, 7(6), e38757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>

- Guerreiro, A., Andrade, M. A., Menezes, C., Vilarinho, F., & Dias, E. (2020). Antioxidant and Cytoprotective Properties of Cyanobacteria: Potential for Biotechnological Applications. *Toxins*, 12(9), 548. <https://doi.org/10.3390/toxins12090548>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33(2), 243–260. doi:10.1016/j.biotechadv.2015
- Hiskia, A., Spooft, L., Kaloudis, T., & Meriluoto, J. (2017). *Determination of Cyanotoxins by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 203–211. doi:10.1002/9781119068761.ch21
- Hossain, M. F., Ratnayake, R. R., Meerajini, K., & Wasantha Kumara, K. L. (2016). Antioxidant properties in some selected cyanobacteria isolated from fresh water bodies of Sri Lanka. *Food Science & Nutrition*, 4(5), 753-758. <https://doi.org/10.1002/fsn3.340>
- Hou Wei, Song Yundi, Lu Nan, Zhang Runjie, Bu Naishun, Miao Bin, He Zhe and Fu Baorong. (2020). Synergy Effect of Environmental Factors on the Growth and Toxins Production by *Microcystis aeruginosa*. Disponible en: <https://doi.org/10.46488/NEPT.2021.v20i02.052>
- Huang, Y., Pan, H., Liu, H., Xi, Y., & Ren, D. (2019). Characteristics of growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* exposed to low concentrations of naphthalene and phenanthrene under different pH values. *Toxicon*, 169, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.004>
- Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471-483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., & Franco, T. T. (2009). *Effect of light cycles (night/day) on CO2 fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 306–310. doi:10.1016/j.cep.2008.04.007
- Jakubowska, N., & Szeląg-Wasielewska, E. (2015). Toxic Picoplanktonic Cyanobacteria—Review. *Marine Drugs*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/md13031497>

- Jorna, F. (2012). Investigating Cyanotoxin Production by Benthic Freshwater Cyanobacteria in New Zealand [University of Canterbury]. [https://ir.canterbury.ac.nz/bitstream/handle/10092/6932/Thesis\\_fulltext.pdf?sequence=2](https://ir.canterbury.ac.nz/bitstream/handle/10092/6932/Thesis_fulltext.pdf?sequence=2)
- Kim HR, Kim CK, Ahn TS, Yoo SA, Lee DH (2005) Effects of temperature and light on microcystin synthetase gene transcription in *Microcystis aeruginosa*. *Key Eng Mater* 277–279: 606–611
- Kruskopf, M., & Plessis, S. D. (2006). Growth and Filament Length of the Bloom Forming *Oscillatoria simplicissima* (Oscillatoriales, Cyanophyta) in Varying N and P Concentrations. *Hydrobiologia*, 556(1), 357-362. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1061-0>
- Kuniyoshi, T. M., Sevilla, E., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2013). Phosphate deficiency (N/P 40:1) induces *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Plant Physiology and Biochemistry*, 65, 120-124. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.011>
- Kurmayer R, Kutzenberger T. (2003) Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Nov;69(11):6723-30. doi: 10.1128/AEM.69.11.6723-6730.2003.
- Lago, L., Barca, S., Vieira-Lanero, R., & Cobo, F. (2015). Características ambientales, composición del fitoplancton y variación temporal de microcistina-LR disuelta en el embalse de As Forcadas (Galicia, NW España). *Limnetica*, 34, 187-204. <https://doi.org/10.23818/limn.34.15>
- Malik, J. K., Bharti, V. K., Rahal, A., Kumar, D., & Gupta, R. C. (2020). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. En *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 467-478). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819090-6.00031-3>
- Martín, B., Pellicer, S., Bes, M., Vela, L., & Sevilla, E. (2007). Las Microcistinas. *Revista de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza*, ISSN 0370-3207, No. 62, 2007, pags. 135-146, 62.

- Martínez-Ruiz, E. B., & Martínez-Jerónimo, F. (2016). How do toxic metals affect harmful cyanobacteria? An integrative study with a toxigenic strain of *Microcystis aeruginosa* exposed to nickel stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.040>
- Melina Celeste, C. M., Lorena, R., Jorge Oswaldo, A., Sandro, G., Daniela, S., Dario, A., & Leda, G. (2017). Mathematical modeling of *Microcystis aeruginosa* growth and [D-Leu1] microcystin-LR production in culture media at different temperatures. *Harmful Algae*, 67, 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.05.006>
- Méndez, P. (2022). Aplicación de extracción asistida por ultrasonidos y microondas a la recuperación de biomoléculas [Tesis de posgrado, Universidad Politécnica de Madrid]. [https://oa.upm.es/71650/1/TFM\\_PALOMA\\_MENDEZ\\_SILVA.pdf](https://oa.upm.es/71650/1/TFM_PALOMA_MENDEZ_SILVA.pdf)
- Mendoza, L. (2016). El género *Sphaerocavum* y dominancia de *S. brasiliense* y *Microcystis wesenbergii* (Microcystaceae, Cyanophyceae) en la floración algal de la laguna Huacachina, Perú. *Revista Peruana de Biología*. 23: 53-60. Doi:10.15381/rpb.v23i1.11835
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. (2013). *State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins*. *Environment International*, 59, 303–327. doi:10.1016/j.envint.2013.06.013
- Meriluoto, J., Lawton, L & Harada, K.. (2001). Isolation and Detection of Microcystins and Nodularins, Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins, Disponible en:
- Meriluoto, J., Lawton, L., & Harada, K. (2001). Isolation and Detection of Microcystins and Nodularins, Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins. *Bacterial Toxins*, 65–87. doi:10.1385/1-59259-052-7:65
- Meriluoto, J., Lawton, L., & Harada, K. (2001). Isolation and Detection of Microcystins and Nodularins, Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins. En O. Holst (Ed.), *Bacterial Toxins: Methods and Protocols* (pp. 65-87). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-052-7:65>
- Mohamed, Z. (2016). Harmful cyanobacteria and their cyanotoxins in Egyptian fresh waters – state of knowledge and research needs. *African Journal of Aquatic Science*, 41(4), 361-368. <https://doi.org/10.2989/16085914.2016.1219313>



- Mohamed, Z. A., Hashem, M., Alamri, S., & Mostafa, Y. (2020). Cyanotoxins and their environmental health risk in marine and freshwaters of Saudi Arabia. *Arabian Journal of Geosciences*, 13(7), 285. <https://doi.org/10.1007/s12517-020-5238-7>
- Nainangu, P., Antonyraj, A. P. M., Subramanian, K., Kaliyaperumal, S., Gopal, S., Sampath Renuka, P., & A, W. A. (2020). In vitro screening of antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities, and characterization of bioactive substances from freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* sp. SSCM01 and *Phormidium* sp. SSCM02. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101772. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101772>
- Nasr, H., Zaher, S., El-Awamri, A. (2012). Factores que posiblemente afecten el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* y *M. flos aquae* aislados del lago superior Wadi El-Raiyan en Egipto en condiciones de laboratorio. *Revista egipcia de biología y pesca acuáticas*, 16(2), 35-46. doi: 10.21608/ejabf.2012.2123
- Nienaber, M., & Steinitz, M. (2018). *A Guide to cyanobacteria Identification and Impact*. The University Press of Kentucky.
- Paerl, H., Otten, T., & Kudela, R. (2018). Mitigating the Expansion of Harmful Algal Blooms Across the Freshwater-to-Marine Continuum. *Environmental Science & Technology*, 52. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05950>
- Pandey, S., Narayanan, I., Vinayagam, R., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Pugazhendhi, A. (2023). A review on the effect of blue green 11 medium and its constituents on microalgal growth and lipid production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 109984. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109984>
- Pérez, D., Soraci, A., & Tapia, M. (2008). CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS: ROL DE LAS MICROCISTINAS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL Y SU DETECCIÓN EN MUESTRAS DE AGUA. *Analecta Veterinaria*.
- Pérez-Morales, A., Olivos, A., Quijano Scheggia, S. I., Espinosa-Rodríguez, C., & Jimenez-Santos, M. (2016). Estado actual del estudio de cianobacterias dulceacuícolas formadoras de florecimientos en el centro de México. (pp. 408-421).
- Polyzois, A. (2020). Improvement of the production of a secondary metabolite with potent anticancer activity in cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC 53789, using abiotic stress:

Phytochemical investigation of this strain [Phdthesis, Université Paris Cité].  
<https://theses.hal.science/tel-03870703>

Polyzois, A. (2022). *Improvement of the production of a secondary metabolite with potent anticancer activity in cyanobacterium Nostoc sp. ATCC 53789, using abiotic stress. Phytochemical investigation of this strain.* Paris: Université de Paris.

Preece, E. P., Hardy, F. J., Moore, B. C., & Bryan, M. (2017). A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. *Harmful Algae*, 61, 31-45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>

Ramón, C. E. R., & Garzón, M. A. G. (2021). Efecto de los parámetros de operación de la extracción asistida por ultrasonido en la obtención de polifenoles de uva: una revisión. *Tecno Lógicas*, 24(51), e1822. <https://doi.org/10.22430/22565337.1822>

Rapala J., Sivonen K., Lyra C., Niemelä S.I., (1997) Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 6, 2206–2212

Ren, X., Wang, Y., Zhang, K., Ding, Y., Zhang, W., Wu, M., Xiao, B., et al. (2023). Transmisión de microcistinas en sistemas naturales y procesos de recursos: una revisión de los riesgos potenciales para la salud humana. *Toxinas*, 15 (7), 448. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3390/toxins15070448>

Reynolds C.S. 2006. *Ecology of phytoplankton.* Cambridge, Cambridge University Press; p. 55

Rojas, T., Fuentes, M., Contreras, E., Gómez, S., & Muñoz, A. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de Sanky (*Corryocactus brevistylus*). *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 85(2), 258-267. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v85n2/a12v85n2.pdf>

Rosso, L., & Giannuzzi, L. (2011). Factores ambientales y antropogénicos que afectan la formación de floraciones de cianobacterias y cianotoxinas. En *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud.* Ministerio de Salud de la Nación. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/112456>

Salomón S, Rivera, C., Zapata A. (2020) Floraciones de cianobacterias en Colombia: estado del conocimiento y necesidades de investigación ante el cambio global. *Rev. Acad.*

- Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(171):376-391, doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1050>
- Sanseverino, I., Conducto, D., Loos, R., & Lettieri, T. (2017). Cyanotoxins: Methods and approaches for their analysis and detection. European Union. <https://ec.europa.eu/jrc>
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M. T., Peleato, M. L., & Fillat, M. F. (2010). Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: Transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology* (London, England), 19(7), 1167-1173. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0500-5>
- Sinha, R. (2022). *Cyanobacteria and Their Importance*. Nova Science Publishers.
- Smith, F.M. (2012). *Investigating Cyanotoxin Production by Benthic Freshwater Cyanobacteria in New Zealand*.
- Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M. M., Liu, Y., & Kaya, K. (1998). Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological Research*, 46(s2), 19-23. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.1998.00120.x>
- Srivastava, A., Ko, S.-R., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., Ravi, A. K., & Asthana, R. K. (2016). *Microcystin Biosynthesis and mcyA Expression in Geographically Distinct Microcystis Strains under Different Nitrogen, Phosphorus, and Boron Regimes*. *BioMed Research International*, 2016, 1–13. doi:10.1155/2016/5985987
- Sun, J., Xu, H., Pei, H., Jin, Y., Li, H., & Ma, C. (2018). Worse than cell lysis: The resilience of *Oscillatoria* sp. during sludge storage in drinking water treatment. *Water Research*, 142, 405-414. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.020>
- Vargas, C. J. (2020). Determinación y cuantificación de compuestos fenólicos en flores de *Taraxacum officinale*, mediante HPLC-DAD-MS y ensayos colorimétricos UV-VIS. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/53951>
- Walls, J. T., Wyatt, K. H., Doll, J. C., Rubenstein, E. M., & Rober, A. R. (2018). *Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria*. *Science of The Total Environment*, 610-611, 786–795. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.1
- Watanabe, M. F., Harada, K., Carmichael, W. W., & Fujiki, H. (1995). *Toxic Microcystis*. CRC Press.

- Wiedner, C., Visser, P. M., Fastner, J., Metcalf, J. S., Codd, G. A., & Mur, L. R. (2003). *Effects of Light on the Microcystin Content of Microcystis Strain PCC 7806. Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1475–1481. doi:10.1128/aem.69.3.1475-1481.2003
- Wurtsbaugh, W. A., Paerl, H. W., & Dodds, W. K. (2019). Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. <https://doi.org/DOI:10.1002/wat2.1373>
- Yan, C., Liu, Y., Yang, Y., Massey, I. Y., Cao, L., Osman, M. A., & Yang, F. (2023). Cardiac Toxicity Induced by Long-Term Environmental Levels of MC-LR Exposure in Mice. *Toxins*, 15(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/toxins15070427>
- You, J., Mallery, K., Hong, J., & Hondzo, M. (2017). *Temperature effects on growth and buoyancy of Microcystis aeruginosa. Journal of Plankton Research*, 40(1), 16–28. doi:10.1093/plankt/fbx059
- Yu, L., Kong, F., Shi, X., Yang, Z., Zhang, M., & Yu, Y. (2015). Effects of elevated CO<sub>2</sub> on dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing strains during *Microcystis* blooms. *Journal of Environmental Sciences*, 27, 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.05.047>
- Zhang, J., Jiang, L., Wu, D., Yin, Y., & Guo, H. (2020). Effects of environmental factors on the growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* under TiO<sub>2</sub> nanoparticles stress. *Science of The Total Environment*, 734, 139443. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139443>

## Anexos

## Anexo A. Materiales, reactivos y equipos

Materiales	Reactivos	Equipos
Frascos de vidrio	Nitrato de sodio	Centrífuga Sigma <sup>®</sup> (Darmstadt, Alemania)
Agitadores	Cloruro de calcio dihidratado	Liofilizador FreeZone 2.5 de LABCONCO <sup>®</sup> (Kansas, Estados Unidos)
Pipetas	Ácido acético	Biofreezer Fisher Scientific <sup>®</sup> R134A (Massachusetts, Estados Unidos)
Tubos de ensayo	Hidróxido de sodio	Micronizador Bead Beater de BIOSPEC <sup>®</sup> (Shanghai, China)
Viales ámbar	n_butanol	Ultrasonido 8893 de Cole-Parmer <sup>®</sup> (Illinois, Estados Unidos)
Tubos para liofilizar	Acetato de etilo	Rotavapor Laborota 4000 (Heildoph, Alemania)
Placas de sílica gel	Cloroformo grado HPLC	HPLC Serie 1200 Agilent Technologies, (St.Clara, CA, USA)
Espátula	Metanol grado HPLC	TLC visualizer de CAMAG <sup>®</sup> (Muttenez, Suiza)
Tubos falcón	Ácido acético grado HPLC	

Cartucho de extracción de fase sólida LiChrolut RP-18 (40-63 µm)	Cristales de yodo	
Columna Nucleosil 100-5 C18 Merck (Darmstadt, Alemania)	Ninhidrina	
	Acido etilendiaminotetraacética sal disódica dihidratado	
	Citrato amónico férrico	
	Nitrato de cobalto hexahidratado	
	Sulfato de magnesio heptahidratado	
	Fosfato dipotásico	
	Sulfato de cobre pentahidratado	
	Sulfato de zinc heptahidrato	
	Nitrógeno gaseoso	
	Ácido bórico	
	Agua destilada	

## Anexo B. Preparación del medio de cultivo BG11 y BG11-M

Medio de cultivo	Medio de cultivo BG11	Medio de cultivo BG11-M
------------------	--------------------------	----------------------------

Componente	Solución Stock	Preparación 500ml	Preparación 500ml
NaNO <sub>3</sub>	1,5 g/L	0.75 g	1.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40 mg/L	500 µL	1000 µL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75 mg/L	500 µL	500 µL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36 mg/L	500 µL	500 µL
Ácido cítrico monohidratado	6 mg/L	500 µL	500 µL
Citrato amónico férrico	6 mg/L	500 µL	500 µL
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	1 mg/L	500 µL	500 µL
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 mg/L	500 µL	500 µL
<b>Soluciones trazas</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 mg/L		
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1.81 mg/L		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.22 mg/L		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.39 mg/L	500 µL	500 µL
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.08 mg/L		
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.05 mg/		
Agua destilada	c.s.p 950 ml/L		
Agua destilada		c.s.p 499 ml	c.s.p 499 ml

Fuente: Autoras

## Anexo C. Método para el análisis por HPLC

Tiempo (Min)	Solución de fase móvil (A) H <sub>2</sub> O con 0,1% ácido acético (%)	Solución de fase móvil (B) Acetonitrilo con 0,1% ácido acético (%)	Flujo de volumen de la columna (mL/min)
0	70	30	1
10	65	35	1
40	30	70	1
45	30	70	1

55	0	100	1
57	0	100	1
80	70	30	1
95	70	30	1

**Señal UV** 220, 225, 230, 235 y 240 nm

## Anexo D. Preparación de la fase móvil y reveladores

<b>Fase móvil 1</b>	
<b>Proporción: 4:3:7</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Acetato de etilo	10 ml
Isopropanol	7.5
Agua	17,5 ml
<b>Fase móvil 2</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Cloroformo	20,7 ml
Metanol	11.1 ml
Agua	3.2 ml
<b>Revelador Ninhidrina</b>	
Ninhidrina	60 mg
N-butanol	20 ml
Ácido acético	0.6 ml
<b>Revelador de Yodo</b>	



Vapores de yodo