



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Efecto de la luz roja en la producción de ficocianina en espirulina (*Arthrospira platensis*) y estimuladas con Ácido indol 3- acético bajo condiciones controladas.

Curipallo Rivadeneira, Alejandra Estefanía

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación previo a la obtención de título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Ortiz Tirado, Juan Cristóbal, Ph.D.



INTRODUCCIÓN

(*Arthrospira platensis*)

500 INDUSTRIAS

6000 toneladas/año

70 %
alimentación



20 %
suplemento
alimenticio

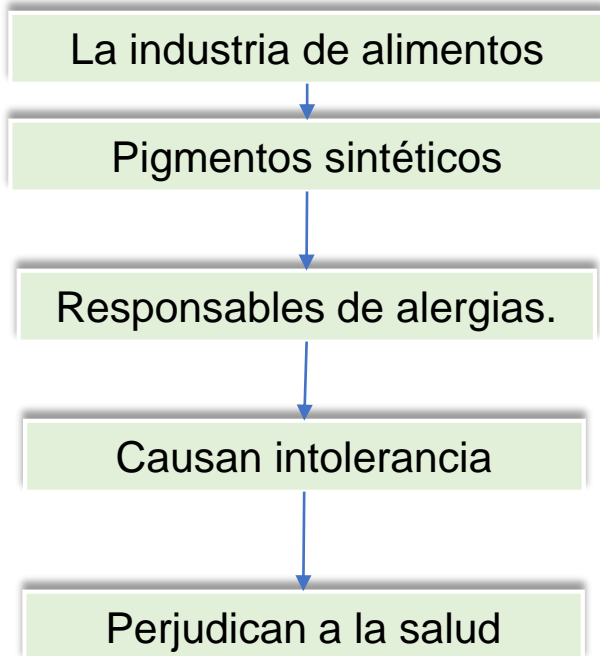


10 % uso
cosmético



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Problema



Ficocianina



Sandoval (2017)
Medios específicos de
espirulina



Benalcázar (2022),
Acido Indol -3- Acético ($10 \text{ mgL}^{-1} \text{AIA}$)



La luz roja aumenta las
concentraciones de
ficocianina

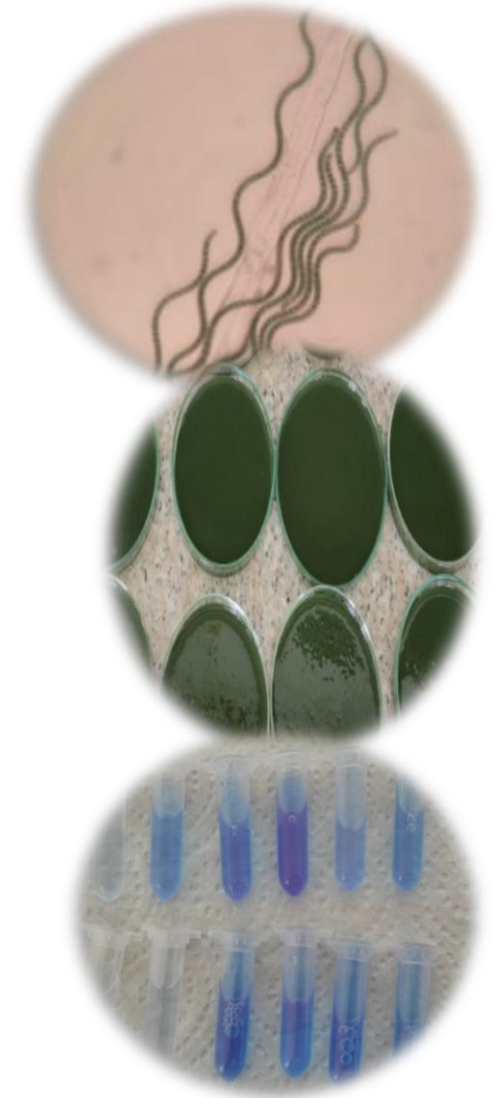
OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la luz roja en la producción de ficocianina en espirulina (*Arthrospira platensis*) estimuladas con Ácido Indol -3- Acético en la Hcda El Prado a 2800 msnm.

Objetivos específicos

- Valorar los parámetros ambientales y productivos de (*A. platensis*) con adición de auxinas naturales 10 mgL^{-1} AIA bajo la acción de la luz roja.
- Determinar la concentración de ficocianina en el cultivo de (*A. platensis*) con adición de auxinas naturales (10 mgL^{-1}) bajo la acción de la luz roja.



HIPÓTEIS

Hipótesis nula

Los tratamientos bajo la interacción luz roja (10:14 luz/oscuridad) y adición de ácido indol -3- acético (10 mgL^{-1} AIA) no tiene efectos sobre la producción de biomasa y concentración de ficocianinas de espirulina (*A. platensis*).

Hipótesis alterna

Los tratamientos bajo la interacción luz roja (10:14 luz/oscuridad) y adición de ácido indol -3- acético (10 mgL^{-1} AIA) tiene efectos sobre la concentración de biomasa y concentración de ficocianinas de espirulina (*A. platensis*).



Arthrospira platensis

Cianobacteria filamentosa de color verde azulada

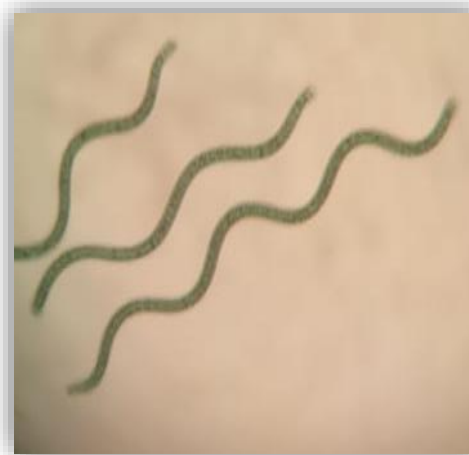
Miden :100 – 500 μm .

Considerada un super alimento

65% de proteínas

20% de hidratos de carbono

3% de humedad



Contenido de nutrientes

Aminoácidos esenciales

6,5% isoleucina

8,7 % leucina

4,7% lisina

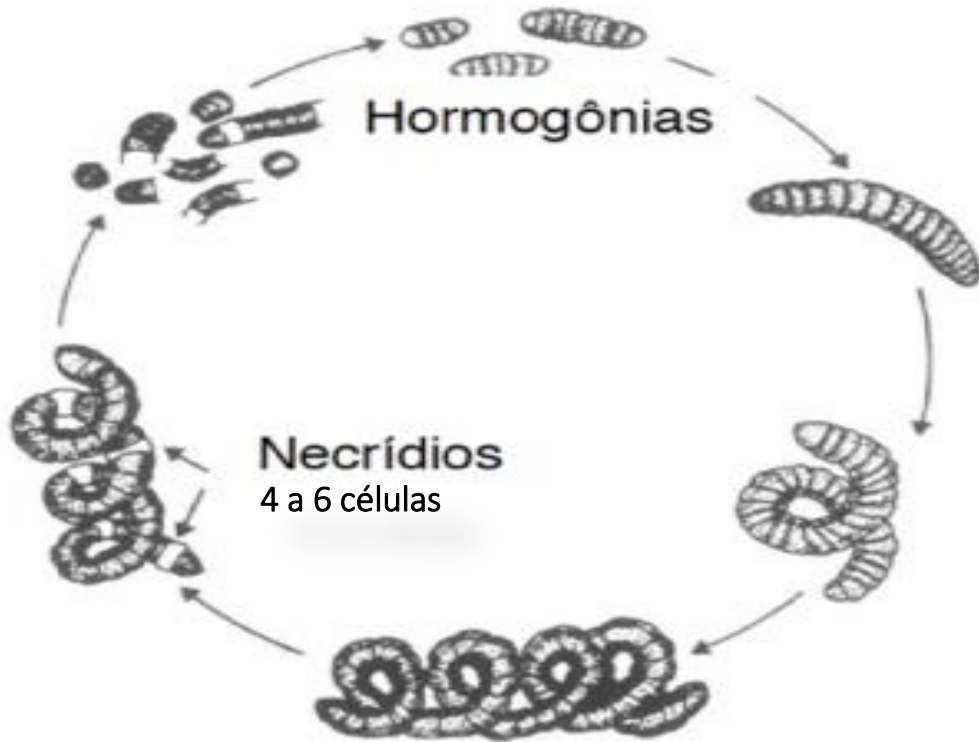
2,3 % metionina

Aminoácidos no esenciales

Ácido glutámico, 14,6%

Ácido aspártico 9,8%

Segunda fase celular



Primera fase celular

La **producción de pigmentos** depende de parámetros físico-químicos como:

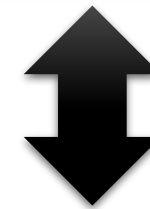
Temperatura Aireación Concentración de CO₂

Fuentes de carbono Concentración de nutrientes; N o P

pH Intensidad de luz

Los pigmentos varían dependiendo de lo que se quiere obtener

A mayor exposición a la luz se obtendrá más cantidad de biomasa



A menor exposición a la luz se obtendrá más contenido de ficocianina



Ficobiliproteínas

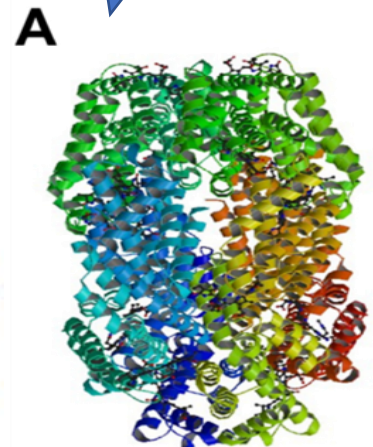
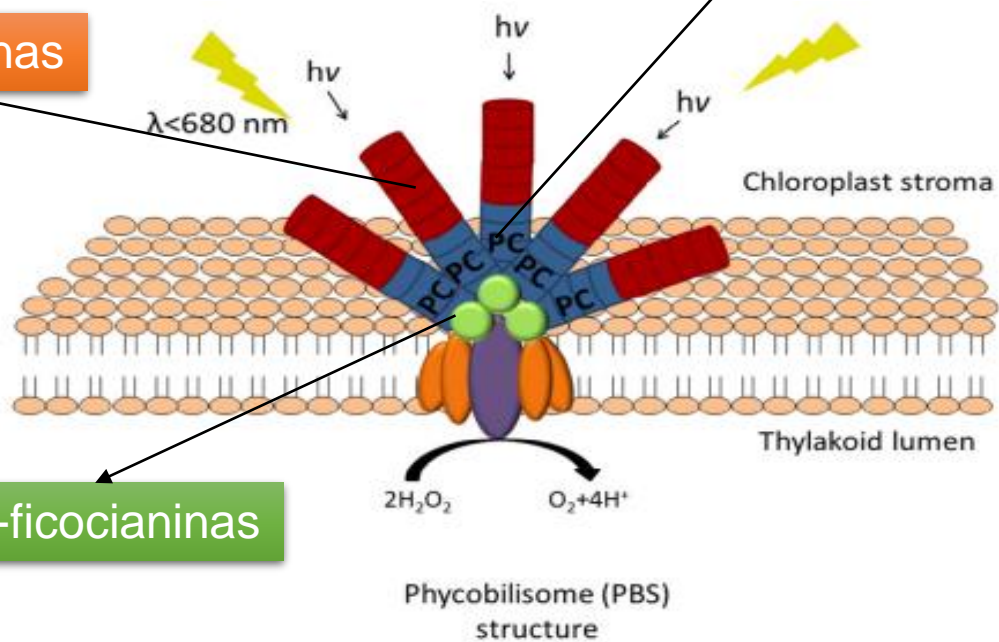
Pigmento fotosintético

20% de la fracción proteica

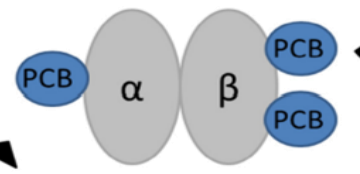
Ficoeritrinas

Ficocianinas

Alo-ficocianinas

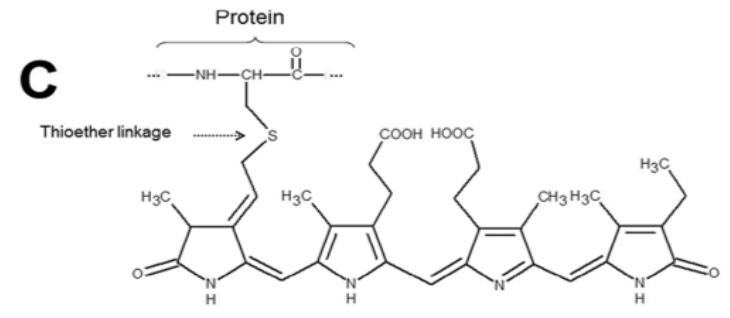


B



2 sub unidades homólogas

C



La pureza de la ficocianina (PC) se evalúa en función de la relación absorbancia (A620/A280).

Activar Windows
Ve a Configuración para activar W

Fotoperiodo

Son ciclos de luz y oscuridad

Efectos sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas

Cumplen un rol en procesos de fijación de nitrógeno, fotosíntesis y división celular

La luz mejora la productividad de *Spirulina*.

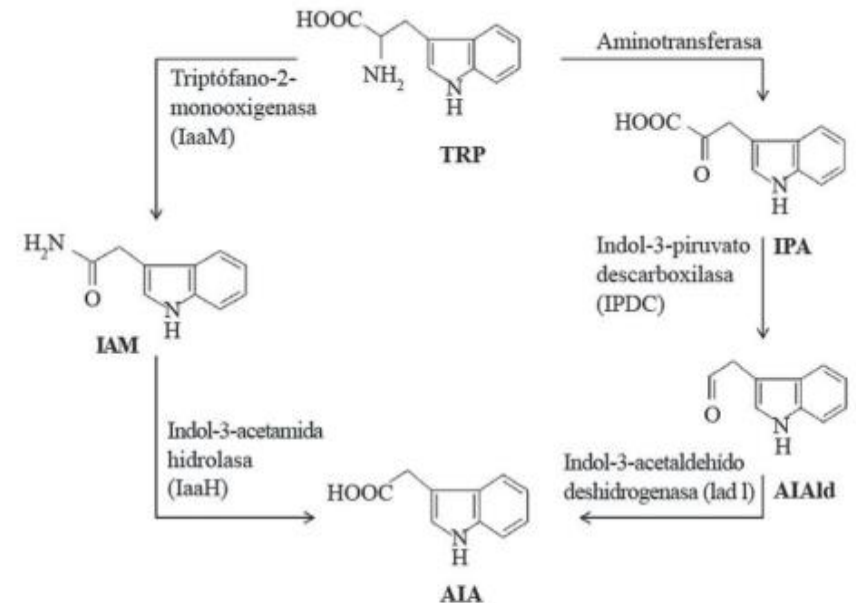
Intensidades de luz superiores a $500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$

Disminuye el contenido de ficocianina (PC)

Auxinas

Hormonas naturales que regulan el desarrollo y crecimiento de plantas provocando procesos de división, elongación y diferenciación celular

Ruta metabólica de AIA



lado derecho, vía indol-3-piruvato (IPA) lado izquierdo, vía indol-3-acetamida (IAM) TRP: triptófano AIA: ácido indol-3-acético
IPA: ácido indol-3-pirúvico AIAlD: ácido indol-3-acetaldehído IAM: indol-3-acetamida.

Figura 3. Vías de biosíntesis de ácido indol-3-acético en bacterias



MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de investigación

El estudio se desarrolló en dos fases, la primera se efectuó en el Laboratorio de Acuicultura y la segunda en el Invernadero cuarentenario perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura IASA I, en la Universidad de las Fuerzas Armadas. Estas instalaciones están ubicadas en las siguientes coordenadas: Longitud $78^{\circ} 24' 44''$ E y una altitud $0^{\circ} 23' 20''$ S, en la Parroquia de San Fernando, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha. Los parámetros ambientales son: Temperatura media de 27°C

Figura 3

Vista aérea de área de laboratorio de acuicultura e invernadero cuarentenario



Nota. Ubicación del proyecto de investigación donde se desarrolló la fase experimental. a. Laboratorio de acuicultura; b. Invernadero cuarentenario. Tomado de Google Earth (2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el efecto de la interacción de la luz roja y blanca más la adición de 0 y 10 mg mL⁻¹ de AIA cada tratamiento tuvo 4 repeticiones (Tabla 1) tratadas en la cianobacteria *Espirulina (Arthrospira platensis)* en condiciones de invernadero.

Las variables de respuesta como: densidad de crecimiento, cinética de crecimiento, producción de biomasa y concentración de ficocianina se caracterizaron mediante estadística descriptiva (media +/- desviación estándar)

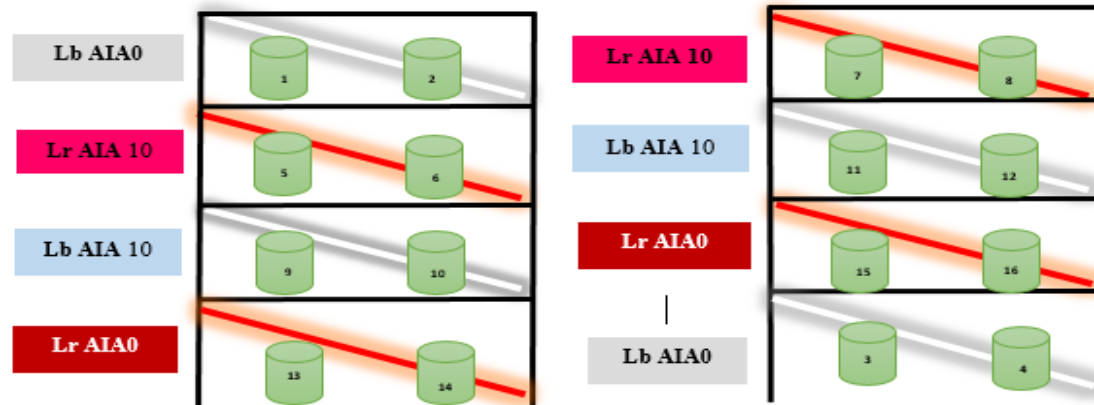
Se realizó análisis de varianza para determinar diferencias significativas en las variables evaluadas en los distintos tratamientos empleando un análisis de comparación Tukey bajo un nivel de confiabilidad del 95%.

Descripción de los tratamientos.

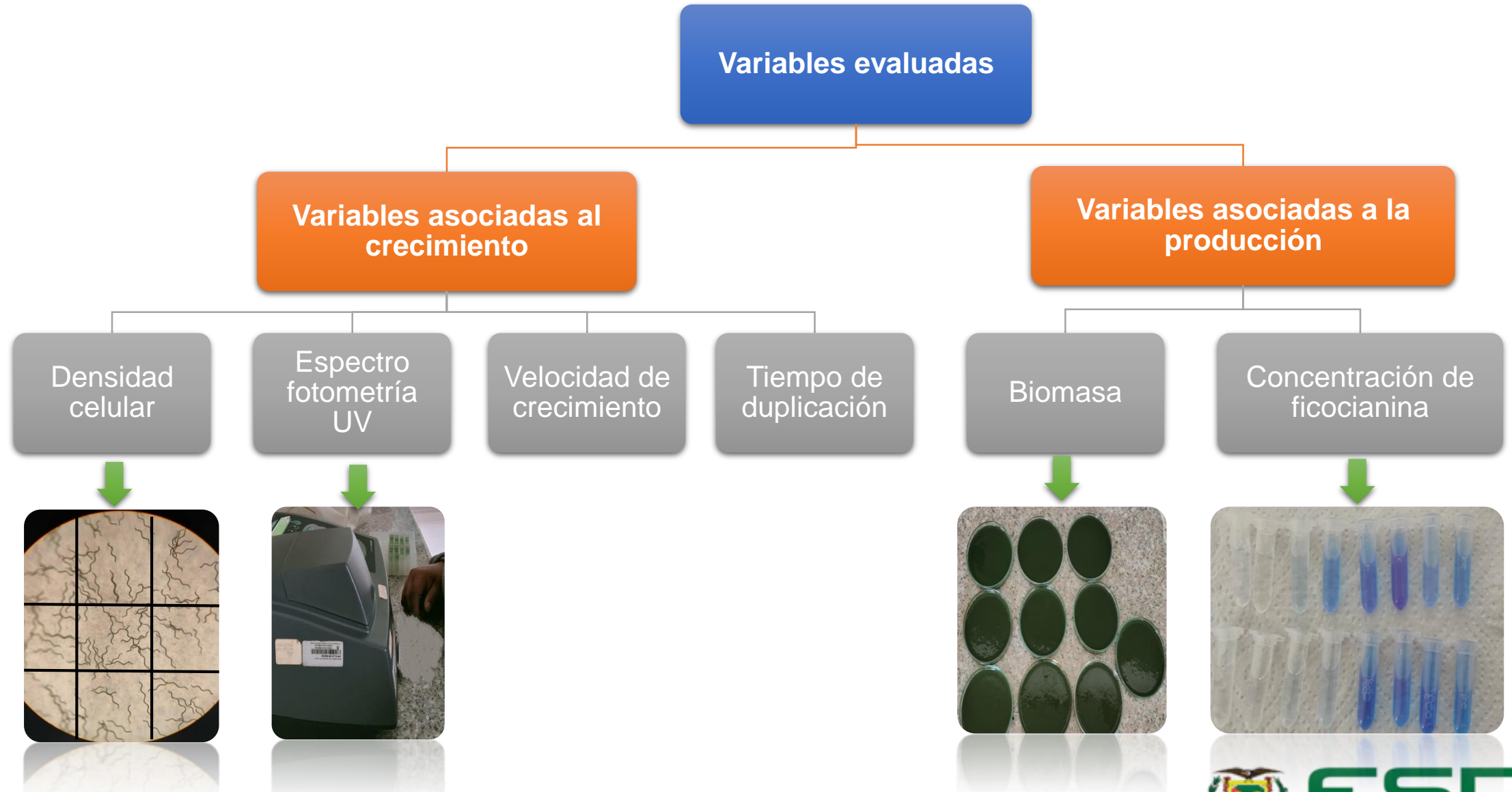
Tratamiento	Código	Descripción
1	LbAIA0	Luz blanca más 0 mg mL ⁻¹ ácido indol 3 acético.
2	LbAIA10	Luz blanca más 10 mg mL ⁻¹ ácido indol 3 acético.
3	LrAIA0	Luz roja más 0 mg mL ⁻¹ ácido indol 3 acético.
4	LrAIA10	Luz roja más 10 mg mL ⁻¹ ácido indol 3 acético.

Nota. Autoría propia

Croquis del diseño experimental en fase de campo



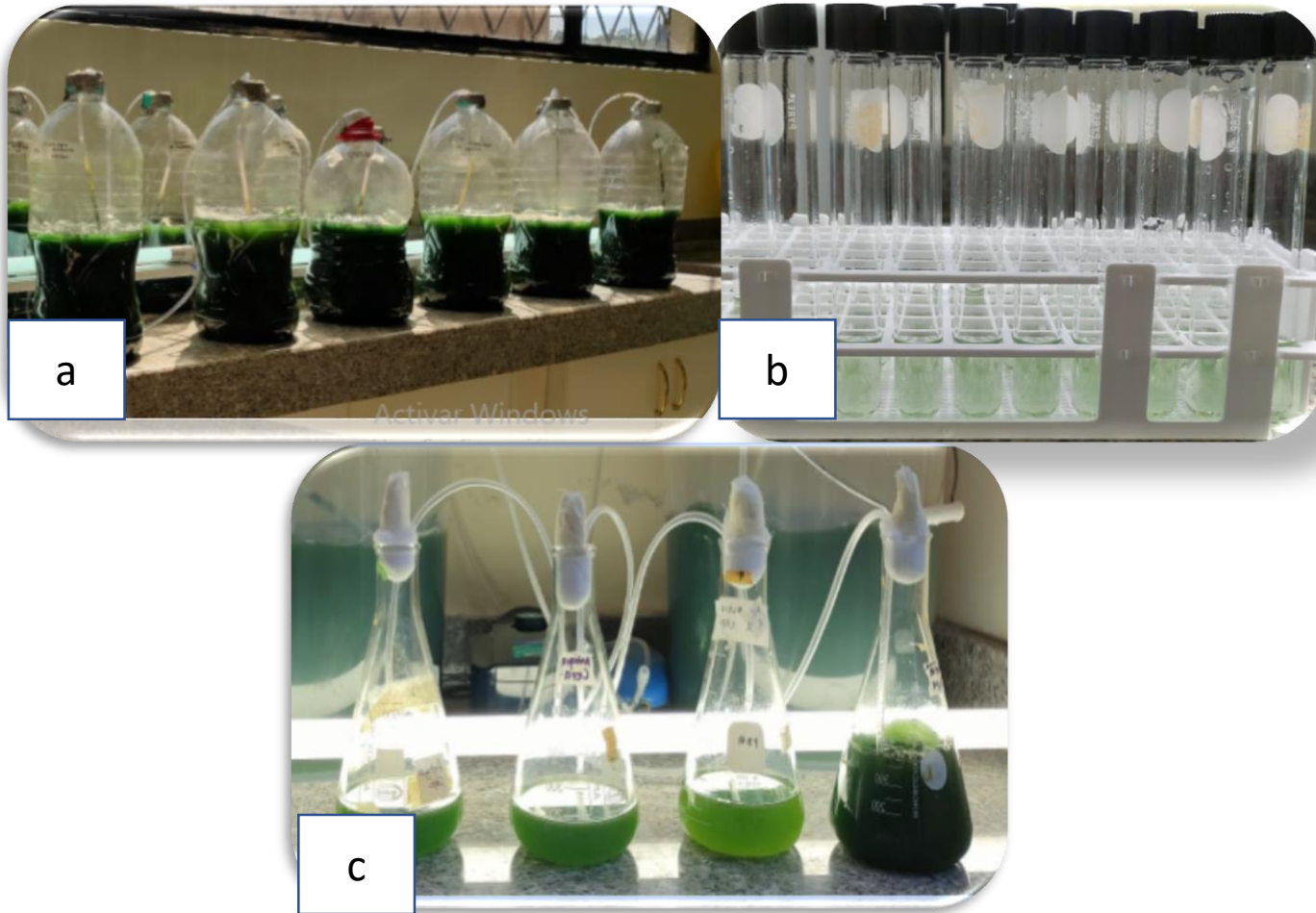
MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de espirulina - Fase 1

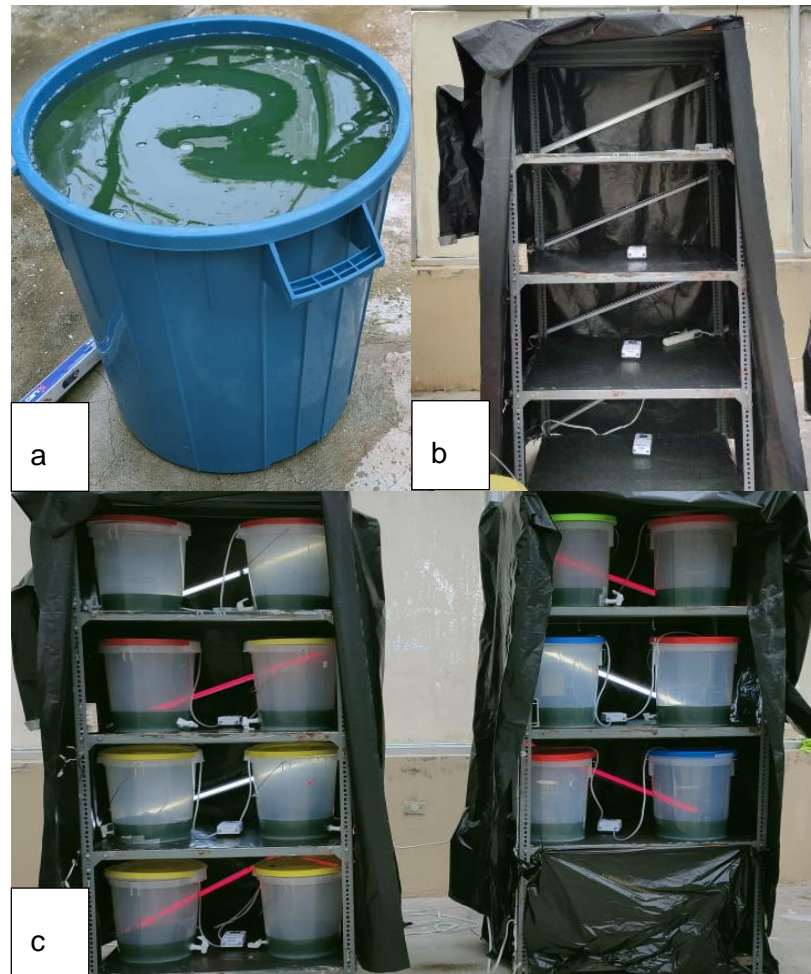
Ubicación del área de investigación : Laboratorio



Nota. El gráfico representa a. fase de crecimiento exponencial, botellones de 4L. b. cultivo seleccionado en tubos de ensayo; c. fase de aceleración, cultivo en matraces de 500 ml c.

- Selección de cepas con las mejores características.
- Reactivación de la cepa; relación 1:3 (1 mL de medio microalgal : 3 mL de medio de mantenimiento).
- Se aplicó el contenido de un tubo de ensayo, con medio microalgal en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL de medio de mantenimiento.
- Tiempo: 15 días.
- La realimentación se la realizó cada 4 días

Ubicación del área de investigación : Invernadero cuarentenario

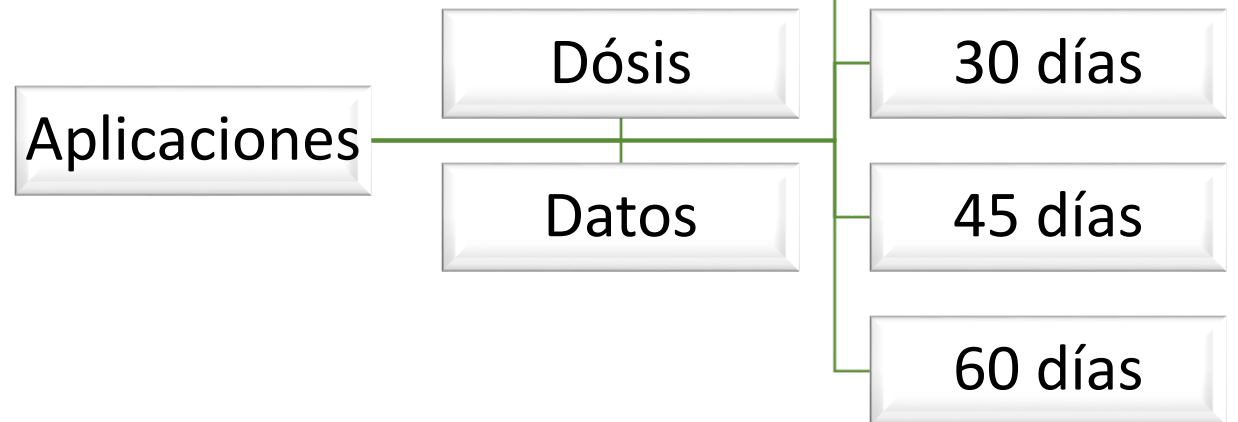


- Se preparó el invernadero, los baldes, y los estantes.
- Los baldes de 20 L^{-1} fueron forrados con plástico negro para evitar el paso de luz solar y permitir el paso de la luz blanca y roja.
- Se homogenizó el cultivo en un balde de 70 L^{-1} hasta llegar a una absorbancia de $5,9 \times 10^4 \pm 4546$ filamentos mL^{-1} .
- Se sembró en cada balde 4 L^{-1} de espirulina.

Preparación y aplicación del Ácido Indol -3- Acético (AIA)



- Se agregó 10 mg L^{-1} de ácido indol 3-acético (AIA) y 10 mg L^{-1} de etanol absoluto.
- Se homogenizó la solución mediante vortex se y se esterilizó por medio de un filtro $0,22 \text{ }\mu\text{M}$.



Se utilizó una relación v/v a 1% para evitar daños a nivel celular



pH y Temperatura

A cada tratamiento se le tomó el pH y Temperatura.



Horario

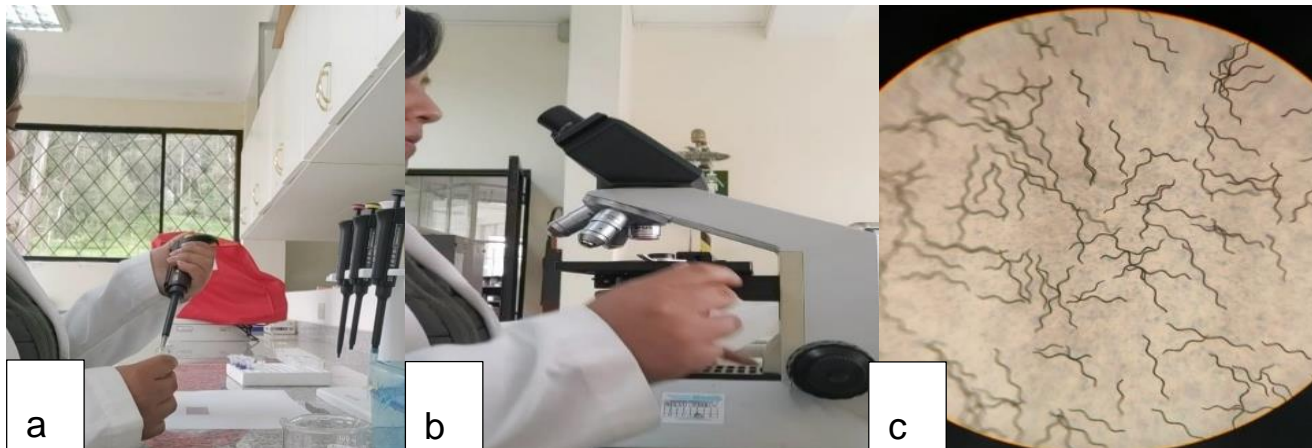
9:00 am
12:00 pm
15:00 pm



Semana

Lunes
Miércoles
Viernes

Densidad celular de *Arthrospira platensis* en campo y laboratorio



- Se preparó una dilución colocando en un tubo eppendorf $900 \mu\text{L}^{-1}$ de agua destilada y $100 \mu\text{L}^{-1}$ de medio microalgal
- Se agitó y se colocó en un porta objetos $10 \mu\text{L}^{-1}$ de la dilución (1:10)
- se cubrió con un porta objetos previamente modificado.
- Para cada unidad experimental se realizó el conteo por triplicado.

Spectrofotometría UV



Nota. El gráfico representa el análisis de absorbancia de las muestras de crecimiento de *Arthrospira platensis*.

Velocidad de crecimiento

$$\mu = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0}$$

Donde:

μ = velocidad de crecimiento
(filamento hora⁻¹)

t_1, t_0 = Tiempo final e inicial

x_1, x_0 = Densidad celular final e inicial en fase logarítmica

Tiempo de duplicación de Arthrospira platensis en campo

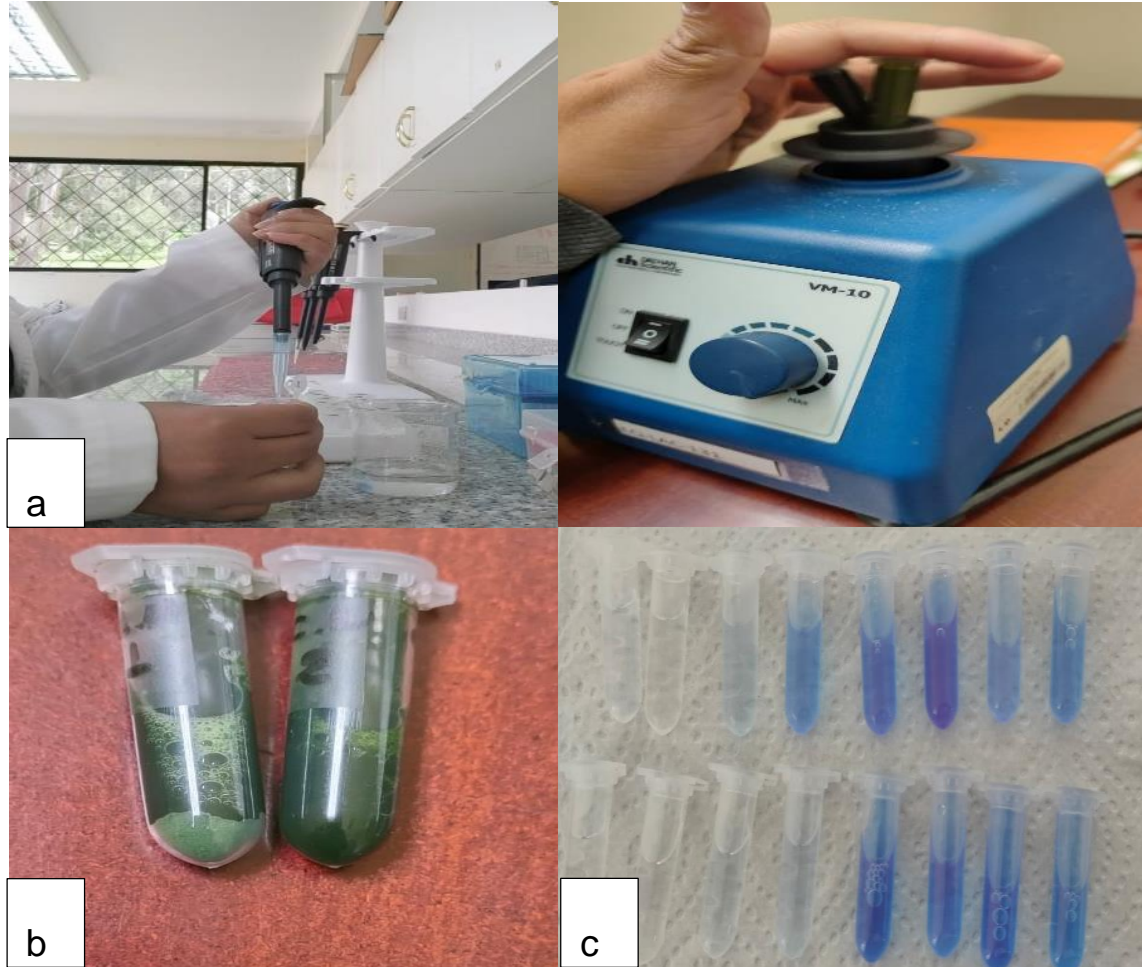
$$T_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde:

T_d = Tiempo de duplicación.

$\ln(2)$ = Logaritmo natural base dos.

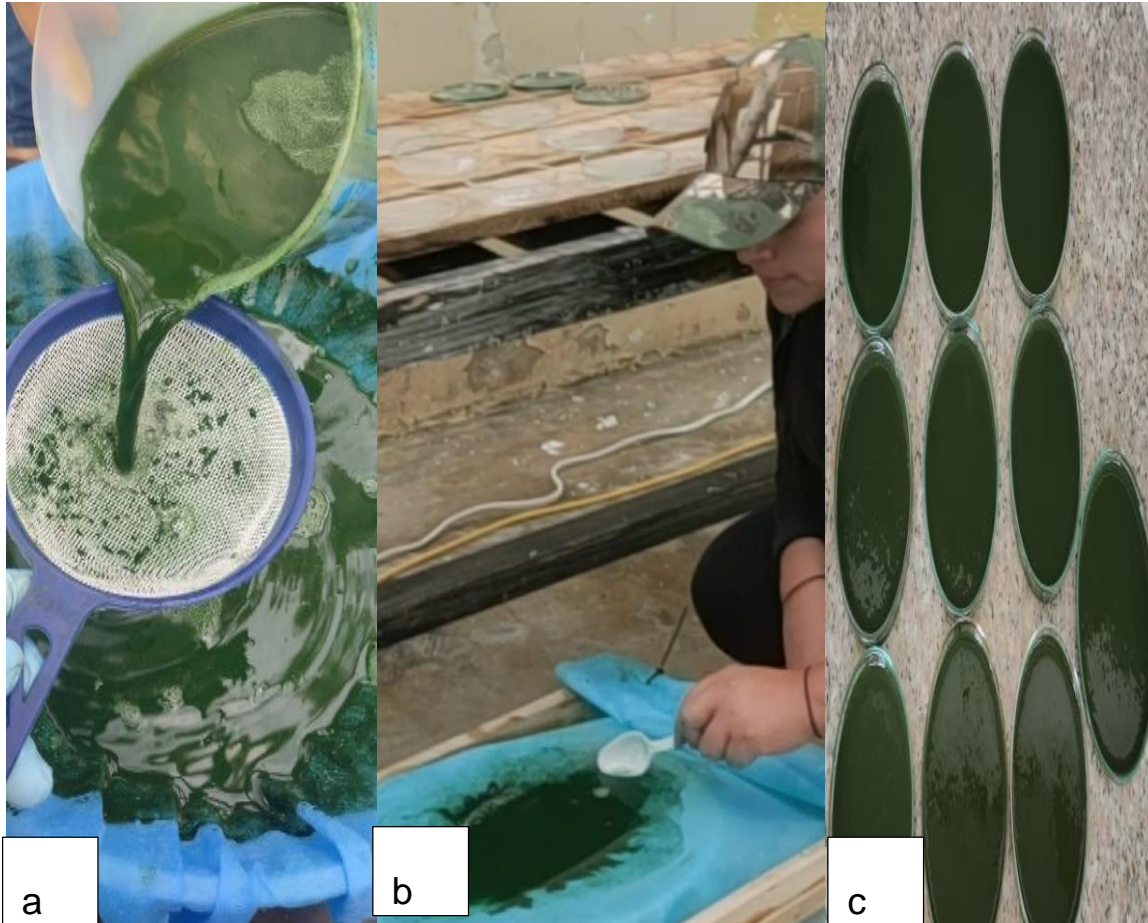
μ = Velocidad de crecimiento (células hora⁻¹)



Concentración de ficocianina

- Se preparó un tampón buffer acetato (20 mM; pH - 5,00)
- Se colocó en un tubo eppendorf 5mL de biomasa
- Se centrifugó a 4000 rpm obteniendo así un sedimento en el que se suspendió 1,5 mL de buffer acetato (50 mM y ácido de sodio 0,002 M)
- Se centrifugó en el vortex y se llevó al congelador. La ficocianina se extrajo por congelación a -20°C y descongelación a temperatura ambiente hasta lograr el color azul.
- Los residuos se eliminaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos.
- El sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de ficocianina mediante espectrofotometría.

Nota. El gráfico representa el proceso para determinar la concentración de ficocianina a. aplicación de buffer acetato en tubos con biomasa; b. tubos con Buffer y biomasa centrifugados en vortex; c. tubos con ficocianina.



Biomasa

- Se cosechó a los sesenta días del experimento
- se realizó la medición de absorbancia para determinar que el cultivo había alcanzado su máximo crecimiento (1,4 de absorbancia).
- Previamente se retiró el oxígeno y la luz durante 3 días,
- Se realizó la cosecha el tercer día, y la biomasa se colocó en cajas Petri.
- Se midió el peso en húmedo.

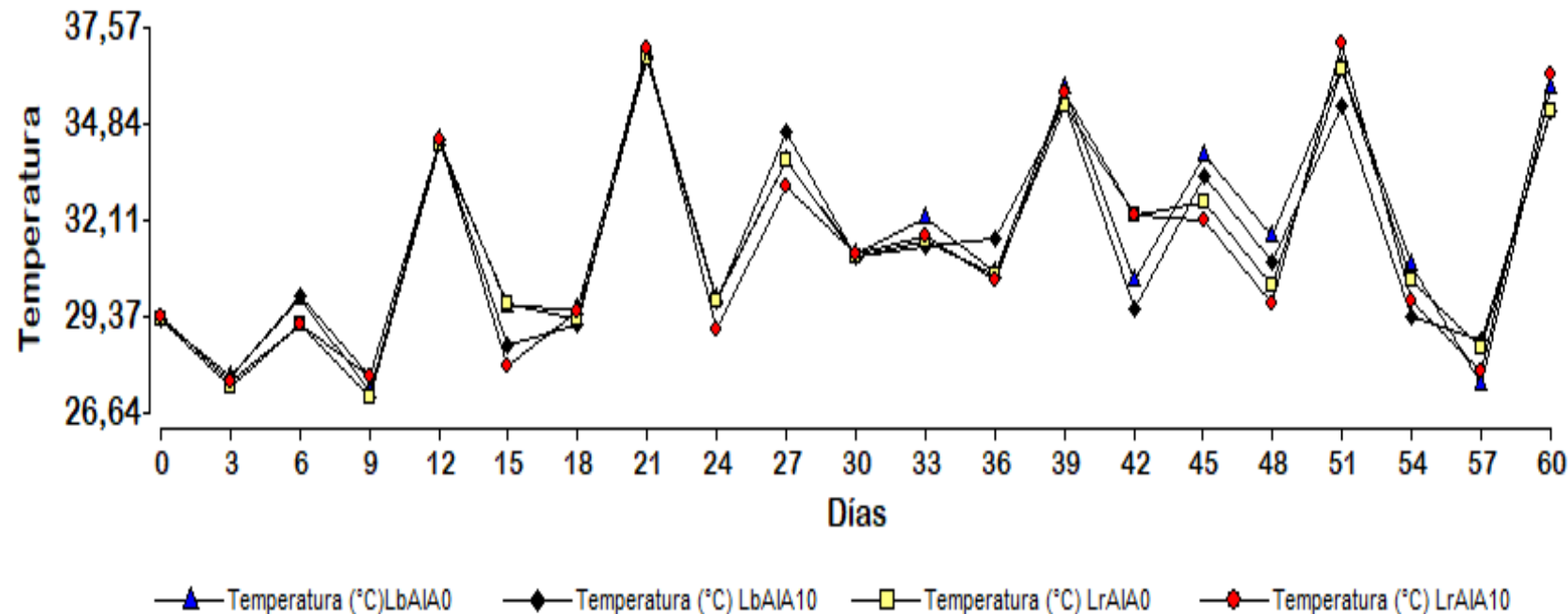
Nota. El gráfico representa el proceso de cosecha para la obtención de biomasa.

a. filtrado de medio microalgal; b. cosecha de biomasa; c. biomasa húmeda en cajas Petri.

Temperatura

Figura 1

Comportamiento de la temperatura durante los 60 días de evaluación.



Kumar et al., (2011)

Álvarez (2022) menciona que, a temperaturas menores de 15° C la cianobacteria presentan un estado de letargo en el desarrollo de los filamentos y temperaturas.

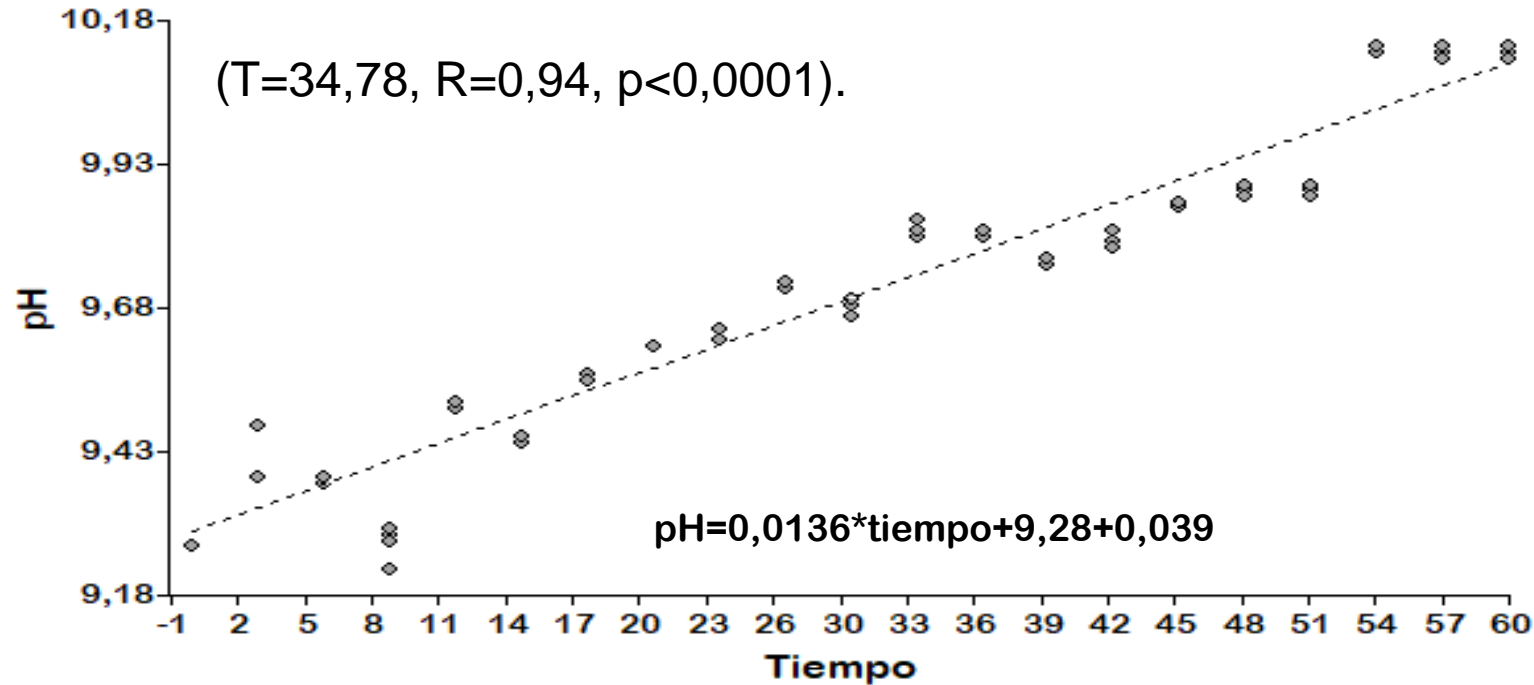
Y a temperaturas superiores 35°C presentan un desarrollo lento y se evidencia muerte celular.

Por lo que se considera que un temperatura adecuada para su desarrollo se encuentra en un rango de los 16 a 35°

Potencial Hidrógeno (pH)

Figura 2

Relación positiva entre el pH y tiempo bajo invernadero.



Benalcázar (2022)

(T=18,33, R=0,93, p>0,001)

Yu *et al.*, (2017)

Adicionar AIA en microalgas disminuye el pH e incrementa la permeabilidad de las células, activando enzimas de polisacáridos que rompen enlaces químicos de glucosa, promoviendo la expulsión de protones de H⁺ que generan una disminución en el pH.

Figura 3

Comportamiento de la luz en la aplicación de los tratamientos: T1, T2, T3, T4.

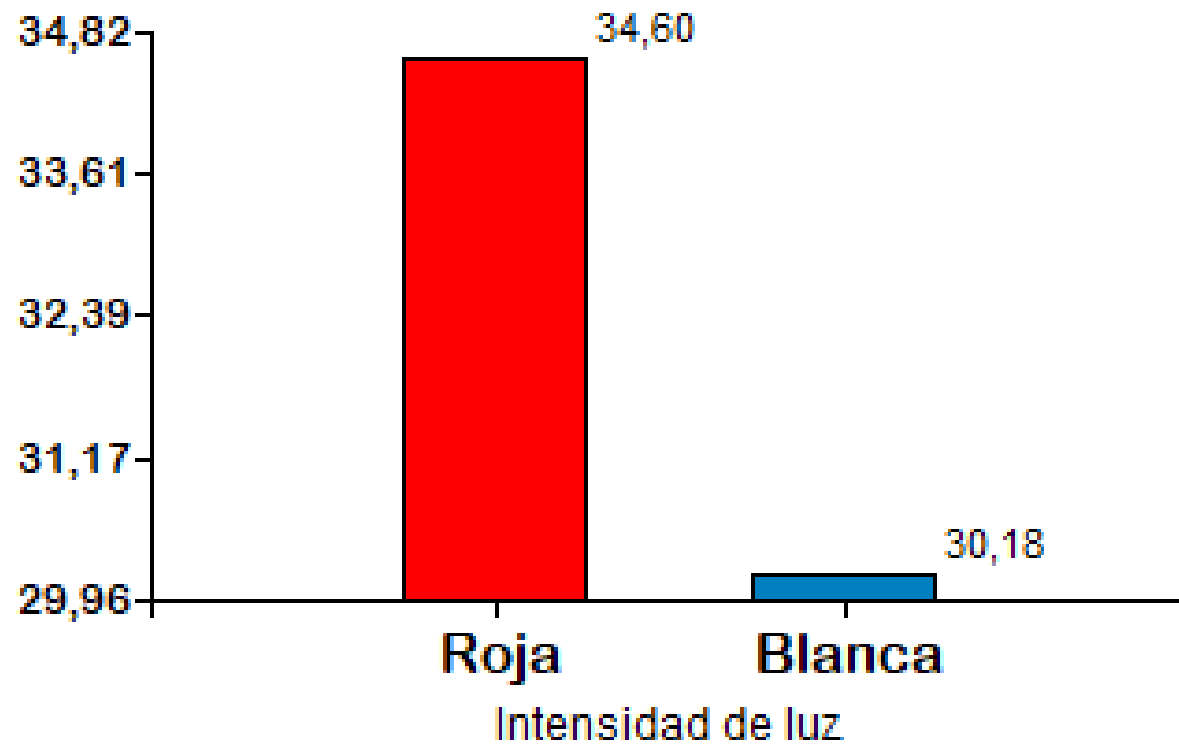


Tabla 1

Intensidades de luz aplicadas a los tratamientos: T1, T2, T3, T4.

Intensidad de luz (μmol m ⁻² s ⁻¹)	
Roja	34,6
Blanca	30,18

Tabla 2

Densidad celular, de Arthrospira platensis en cuatro tratamientos bajo invernadero.

Tratamiento	Media ± DE			
	Luz	AIA	(10 ⁵ filamentos mL ⁻¹)	
T4	Lr	10	7,20± 2,02	a
T2	Lb	10	6,69± 2,02	ab
T3	Lr	0	6,86 ± 2,02	ab
T1	Lb	0	6,22± 2,02	c

(Benalcázar, 2022)

D. celular= 6,48 x10⁵ filamentos mL⁻¹

Auz (2019)

D. Celular= 17,44x10⁶ ±0,28 células mL⁻¹

Nota. La tabla representa los promedios y las desviaciones estándar de la densidad celular para Arthrospira platensis. T1: LbAIA0; T2: LbAIA10; T3: LrAIA0; T4:LrAIA10. Medidas con una letra en común no son significativamente diferentes (Tukey; p<0,05). Lr: Luz roja.; Lb: Luz blanca; AIA. Ácido Indol acético.

Densidad y absorbancia

Figura 4

Curva de crecimiento de *Arthrospira platensis* con la aplicación de Tratamientos: T1, T2, T3, T4 bajo invernadero.

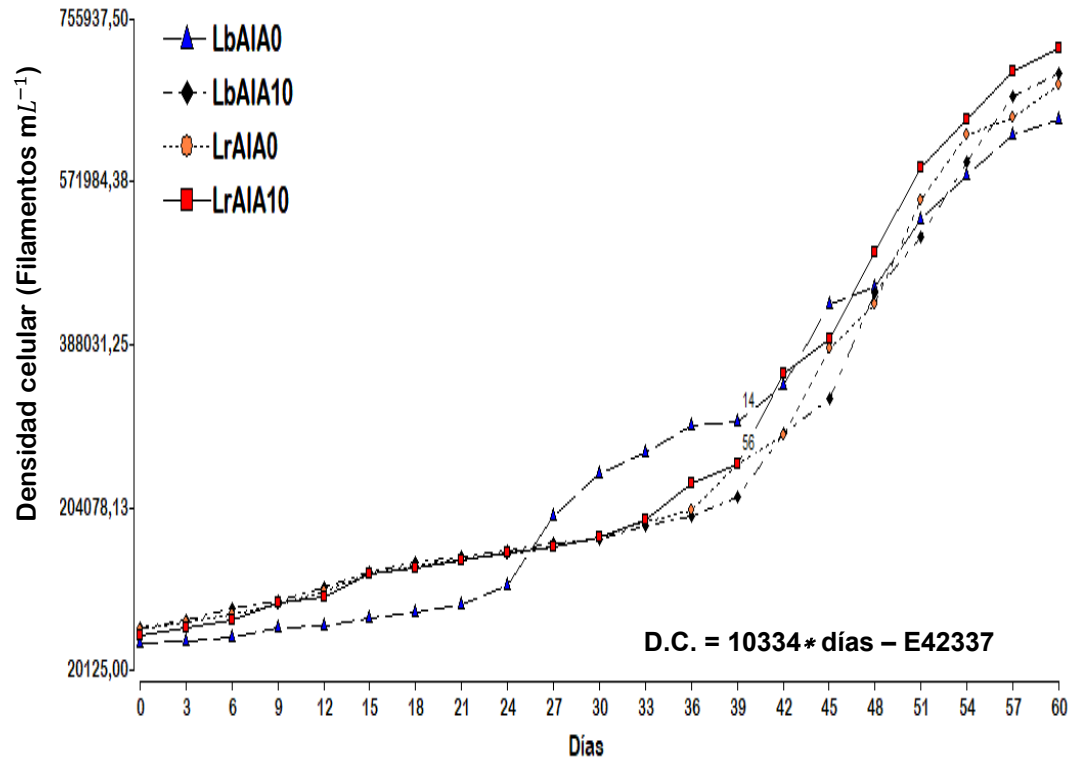
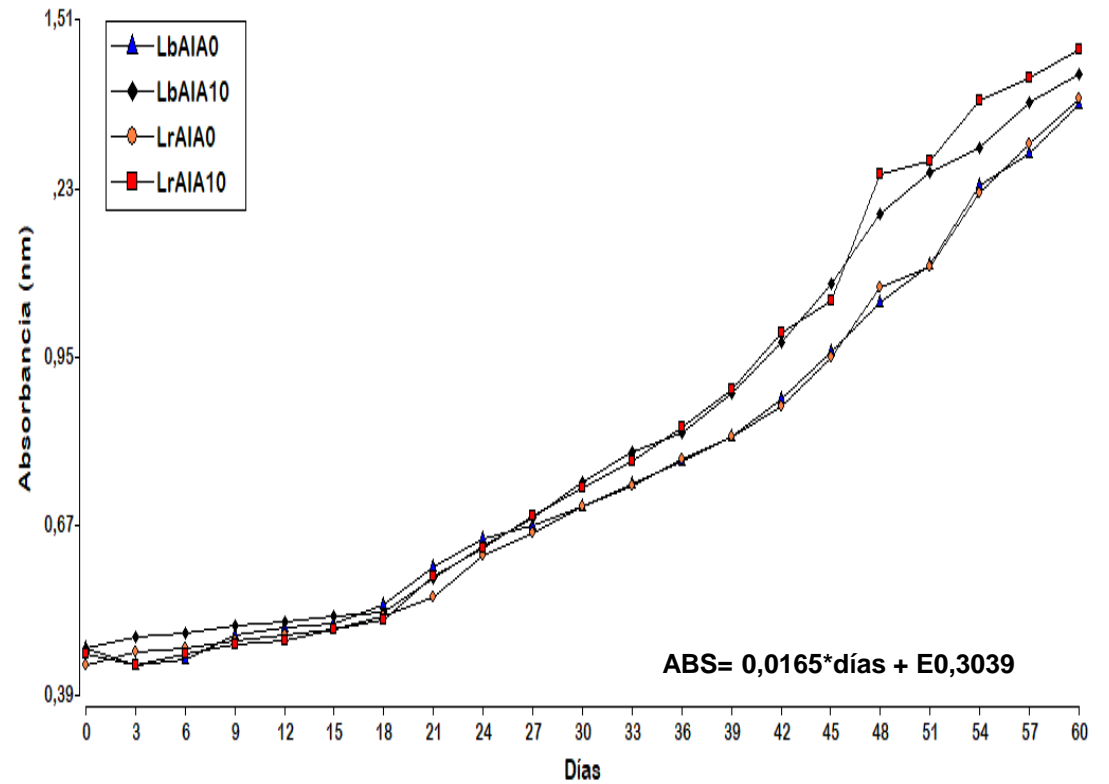


Figura 5

Comportamiento del crecimiento de *Arthrospira platensis* por espectro fotometría UV.



Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación

Tabla 3

*Promedio \pm desviación estándar de los parámetros cinéticos del crecimiento celular en *Arthrospira platensis* bajo invernadero.*

Tratamiento	Velocidad de crecimiento (μ) (1×10^3 Filamentos día $^{-1}$)		Tiempo de duplicación (Td) (h $^{-1}$)	
T4	195 \pm 0,01	a	10,46 \pm 0,64	a
T2	089 \pm 0,01	b	7,99 \pm 0,64	ab
T3	118 \pm 0,01	b	5,93 \pm 0,64	b
T1	068 \pm 0,01	b	5,43 \pm 0,64	b

(Álvarez 2018)

V. Crecimiento= 320 filamentos día $^{-1}$

T. Duplicación= 2,16 h $^{-1}$

Benalcázar (2022)

V. Crecimiento= 93 filamentos día $^{-1}$

T. duplicación = 7,47 horas $^{-1}$

Hussin et al (2021)

V. Crecimiento= 7,47 horas $^{-1}$

T. duplicación = n.d

Producción de biomasa

Tabla 4

Promedio \pm desviación estándar de la producción de biomasa bajo aplicación de tratamientos T1, T2, T3, T4

Tratamiento	Biomasa producida (g L ⁻¹)	
T4	12,25 \pm 0,65	a
T2	9,50 \pm 0,65	b
T3	7,00 \pm 0,65	b
T1	2,75 \pm 0,65	c

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p > 0,05$).

Chen et al., (2013)

Biomasa= 2,25 gL⁻¹

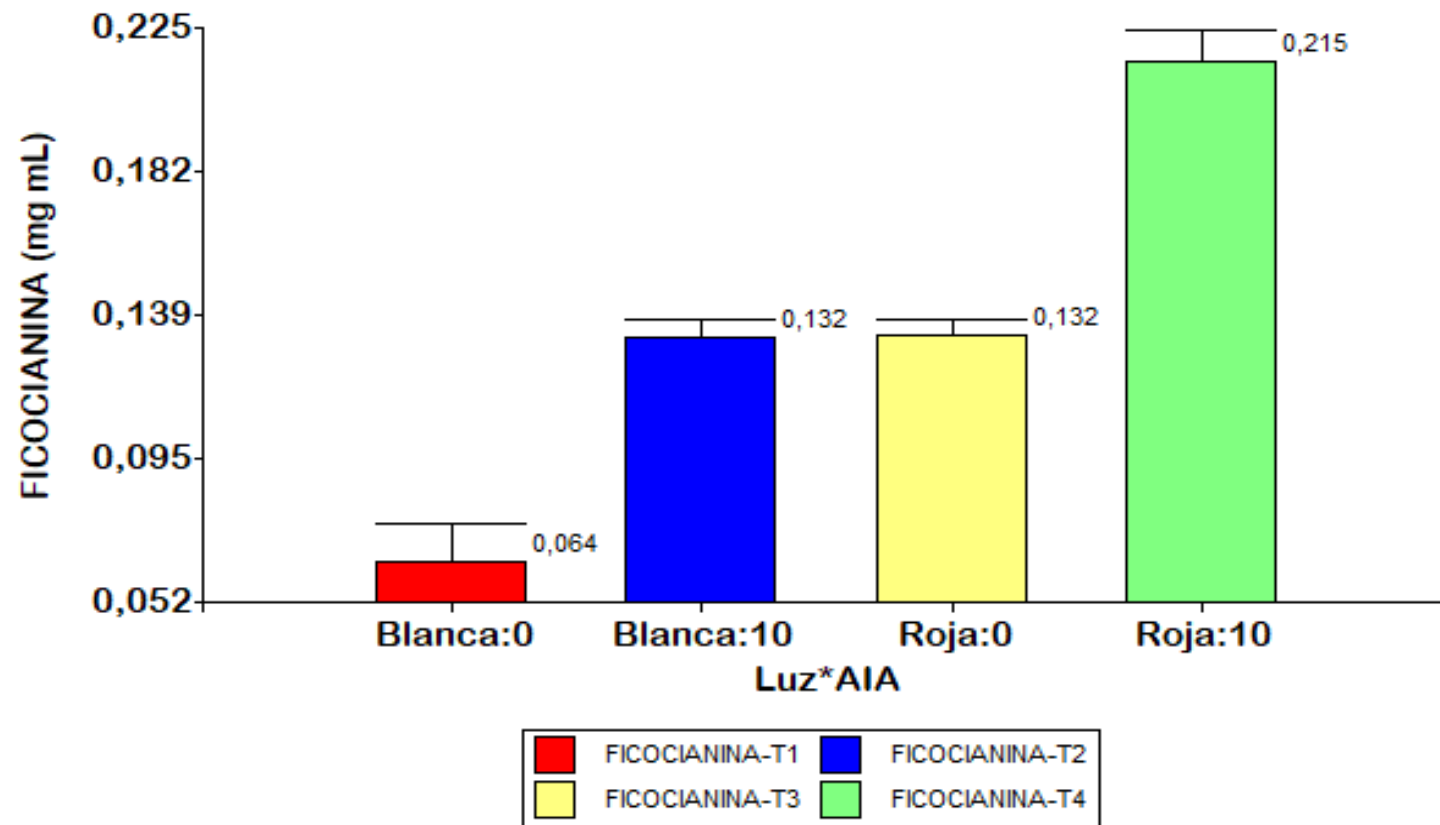
Ferreira et al., (2015)

Biomasa= 2,12 g L⁻¹

Concentración de ficocianina

Figura 6

Efecto de la interacción intensidad de luz más AIA aplicado en T1, T2, T3, T4



Wang et al., (2007)

Ondas de luz = $34,30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Ficocianina = $0,215 \text{ mg. mL}^{-1}$

Tolaza, (2019)

Ondas de luz $48,6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Ficocianina = $0,390 \text{ mg. mL}^{-1}$

CONCLUSIONES

- El cultivo de espirulina (*Arthrospira platensis*), presentó los mejores resultados cinéticos en velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación, para el tratamiento con luz roja y 10 mg L⁻¹ de AIA obteniendo 195 ± 10 filamentos día⁻¹ y 10,46 ± 0,64 h⁻¹ respectivamente.
- El tratamiento de Luz roja con dosis de 10 mg L⁻¹ AIA en espirulina (*Arthrospira platensis*) potenciaron su productividad, sin embargo, temperaturas superiores a los 35°C durante los primeros 15 días provocaron un crecimiento lento en la cianobacteria, por lo tanto, su crecimiento en el tiempo se prolongó a 60 días, teniendo un efecto positivo en la densidad celular con 7,23x10⁵ filamentos mL⁻¹.
- La producción de biomasa presentó los mejores resultados con la aplicación del tratamiento con Luz roja y 10 mg L⁻¹ AIA, obteniendo 12,25 g L⁻¹.
- Las interacciones entre los factores Luz y AIA además de las condiciones ambientales influyeron en la producción de ficocianina, siendo esta significativamente diferente a los demás tratamientos.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de luz roja más la aplicación de 10 mg mL^{-1} AIA debido a que presentó las mejores promedios en densidad celular, cantidad de biomasa y contenido de ficocianina.
- Se recomienda controlar la temperatura y no exceder los límites recomendados sobre 35°C ya que temperaturas superiores provocan muerte celular.
- Se recomienda realizar una investigación con distintas irradiaciones de luz LED roja desde 50, 100, 150 y $600 \mu\text{mol/m}^2.\text{s}^{-1}$ más la aplicación de dosis de 10 mg L^{-1} AIA para evaluar si las distintas irradiaciones aumentan las concentraciones de ficocianina una vez extraída.
- Se recomienda aplicar otras técnicas de extracción (congelación, uso de diferentes buffers, etc.) para una mayor extracción de ficocianina, además de evaluar la pureza y calidad del producto.



Gracias