

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Efecto de la composición espectral de luz en la  
composición bioquímica y estandarización de  
procedimientos para el análisis de la expresión génica  
de *Arthrospira (Spirulina) maxima***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Eugenio García Álvarez**

Ensenada, Baja California, México  
2022

Tesis defendida por  
**Eugenio García Álvarez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Codirectora de tesis

---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
Codirectora de tesis

Miembros del comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dra. María Asunción Lago Lestón



---

**Dr. Roberto Cruz Flores**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

*Eugenio García Álvarez © 2022*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y directores de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Eugenio García Álvarez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Efecto de la composición espectral de la de la luz en la composición bioquímica y estandarización de procedimientos para el análisis de la expresión génica de *Arthrospira (Spirulina) maxima***

Resumen aprobado por:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Codirectora de tesis

---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
Codirectora de tesis

Las cianobacterias son microorganismos fotosintetizadores capaces de producir biomasa a partir de la luz, nutrientes y dióxido de carbono. El género *Arthrospira* ha sido utilizado en la industria cosmética, nutracéutica y acuícola debido a su alto contenido de pigmentos, proteínas y vitaminas. Los cambios en las condiciones de luz con la que *Arthrospira maxima* es cultivada, activan la síntesis metabólica de compuestos específicos induciendo un cambio en el metabolismo, así como en su composición proximal. El objetivo de este trabajo fue evaluar en cultivos de *Arthrospira maxima* el efecto de la luz blanca, azul, verde y roja en la composición proximal, producción de ficocianina, fotosíntesis y estandarizar los protocolos necesarios para el análisis de expresión génica. Para evaluar el efecto de la composición espectral de la luz en los cultivos, se usaron lámparas fluorescentes con irradiancia de  $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz azul (403-540 nm), verde (510-556 nm), rojo (613-679 nm) y blanca como tratamiento control. Durante la fase exponencial del cultivo de *Arthrospira maxima* se midió la tasa de crecimiento, cantidad de pigmentos, eficiencia fotosintética y composición proximal. La luz roja produjo un incremento de la tasa de crecimiento en *Arthrospira maxima* ( $0.51$  divisiones  $\text{día}^{-1}$ ) y el menor crecimiento fue evaluado en los cultivos en luz azul ( $0.33$  divisiones  $\text{día}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). El mayor contenido de clorofila a fue medido en los cultivos con luz blanca ( $0.94 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), y los menores menor valores con luz roja ( $0.188 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). La mayor cantidad de ficocianina se evaluó en los cultivos mantenidos con luz roja ( $7.63 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y los menores valores fueron con luz verde ( $5.41 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y luz blanca ( $5.81 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). El mayor valor de la máxima eficiencia cuántica ( $F_v/F_m$ ) fue medida con luz azul ( $0.33$ ). La mayor producción de proteínas se obtuvo con la luz verde ( $64.27 \pm 2.44\%$ ) y los menores valores con la luz roja ( $44.29 \pm 4.98\%$ ). La mayor producción de carbohidratos fue medida con luz roja ( $25.97 \pm 5.91\%$ ) y los menores valores con luz azul ( $10.36 \pm 0.85\%$ ). Los mayores valores de producción de lípidos se encontraron con luz blanca ( $13.41 \pm 0.81\%$ ) y los menores valores con luz azul ( $10.72 \pm 0.22\%$ ). Para *Arthrospira maxima* se estandarizó la amplificación de varios genes de relevancia metabólica como los de shock térmico (*HSP90*), la enzima RuBisCO (*rbcL*), la enzima glutamato sintasa (*GOGAT*), la enzima superóxido dismutasa (*FeSOD*), la subunidad alfa de ficocianina (*PcA*), la proteína chaperona *dnaK*, la enzima clave en la síntesis de ácidos grasos (*fabZ*) y el gen constitutivo *16S* ARNr. La composición espectral de la luz produce cambios en el metabolismo de *Arthrospira maxima* que originan diferencias en la tasa de crecimiento, la composición proximal, el peso seco, la longitud de filamentos y en la eficiencia fotosintética.

**Palabras clave:** *Spirulina*, *Arthrospira maxima*, composición espectral, producción de proteína y expresión génica.

Thesis summary presented by Eugenio García Álvarez as a partial requirement in order to achieve the Master of Aquaculture Sciences Degree.

**Light spectral composition effect on the biochemical composition and protocol standardizations for gene expression analysis of *Arthrospira (Spirulina) maxima***

Summary approved by:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Codirector of tesis

---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
Codirector of thesis

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that produce biomass from light, nutrients, and carbon dioxide. The genus *Arthrospira* has been used for the cosmetic industry, nutraceutical, and aquaculture due to its high contentment of pigments, proteins, and vitamins. The changes in the light spectrum for *Arthrospira maxima* cultures directly activate the metabolic synthesis of specific compounds resulting in metabolic changes and their proximal composition. The aim of this study was to assess the effect of white, blue, green, and red light in *Arthrospira maxima* cultures related to their proximal composition, phycocyanin content, photosynthetic performance, and the protocol standardization for gene expression analysis. For the evaluation of the spectral essay of the light on the cultures was used fluorescent lamps were at an irradiance of  $50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of blue (403-540 nm), green (510-556 nm), red (613-679 nm) and white light as control treatment. During the exponential growth phase of *Arthrospira maxima* cultures was measured the growth rate, pigment content, photosynthesis efficiency, and proximal composition. Red light produced on *Arthrospira maxima* increased the growth rate ( $0.51 \text{ divisions day}^{-1}$ ) and the lower values with blue light ( $0.33 \text{ divisions day}^{-1}$ ). The highest chlorophyll content was measured in white light ( $0.94 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), and the lowest values in red light ( $0.188 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). The highest phycocyanin production was estimated in the cultures maintained with red light ( $7.63 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), and the lowest values were with green light ( $5.41 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and white light ( $5.81 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). The higher value of the maximum quantum efficiency (Fv/Fm) was measured in blue light (0.33). The higher protein production was obtained in green light ( $64.27 \pm 2.44\%$ ), and lower values were with red light ( $44.29 \pm 4.98\%$ ). The highest carbohydrate content was measured in red light ( $25.97 \pm 5.91\%$ ), and the lower values with blue light ( $10.36 \pm 0.85\%$ ). The highest lipid production was found in white light ( $13.41 \pm 0.81\%$ ), and the lowest values in blue light ( $10.72 \pm 0.22\%$ ). For *Arthrospira maxima* several metabolic-relevant genes were amplified as thermal stress protein (*HSP90*), RuBisCO enzyme (*rbcL*), glutamate synthase enzyme (*GOGAT*), superoxide dismutase enzyme (*FeSOD*), the alpha subunit of phycocyanin (*PcA*), chaperon protein (*dnaK*), the key enzyme in fatty acid biosynthesis (*fabZ*) and housekeeping gene *16S rRNA*. The spectral composition of light produces metabolic changes in *Arthrospira maxima* that induce differences in the growth rate, proximal composition, dry weight, the length of filaments, and the photosynthetic efficiency.

**Keywords:** *Spirulina*, *Arthrospira maxima*, spectral composition of light, protein production, gene expression.

## Dedicatoria

*Dedicado a:*

*A mi padre, el †Dr. Eugenio García Flores por compartirme ese gusto y pasión por el conocimiento y también el sentido diligente por la familia.*

*A mi amada esposa, porque somos... diferentes.*

*A la bióloga †Lynn Margulis porque la historia de la publicación de su teoría de la endosimbiosis seriada ha marcado mucho en mi formación científica.*

*Al biólogo Antonio Lazcano porque su visión de la biología y sus contribuciones a la situación actual de la ciencia en México son una inspiración para mí.*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría teniendo como número de becario 19214493.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por aceptarme como estudiante, por permitirme crecer dentro de él, por permitirme el uso de sus instalaciones y recursos para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al apoyo económico para la realización de la parte experimental de fisiología de microalgas del presente proyecto de tesis obtenido por medio del FIDEICOMISO del CICESE cuenta 623801. Además del apoyo del proyecto con recursos fiscales cuenta interna del CICESE 623108. Se contó con el y apoyo económico para la realización de la parte experimental de genómica funcional con recursos de la cuenta interna 682-136. Se agradece al Posgrado de Acuicultura por otorgarme un mes de beca para la terminación de la escritura de la tesis.

A mi codirectora de tesis la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, por permitirme formar parte de su grupo de estudiantes, por darme la oportunidad de conocer el mundo de las microalgas y enseñarme a detalle de ellas en su clase, por la asesoría y dirección académica de mi tesis y, por último, por darme a elegir mi tema de tesis. A mi codirectora de tesis la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez, por permitirme ser de su grupo de estudiantes, por abrirme las puertas de su laboratorio y por enseñarme a mejorar mi bitácora.

A mis sinodales, la Dra. Asunción Lago Lestón, por sus clases de bioinformática que tanto disfruté. Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por enseñarme una genética tan útil y de la cual sabía poco, la genética cuantitativa.

A los técnicos de laboratorio y posdoctorados que contribuyeron a mi formación académica: a la Dra. Ceres Molina Cárdenas por su trato tan humano y accesibilidad, así como su asesoría en el laboratorio. A la M. en C. Fátima Castro Ochoa gracias por apoyarme con tus asesorías en el laboratorio y enseñarme el vegetarianismo. A la Dra. Claudia Ventura por las clases de qPCR, por asesorarme, por escucharme, por tenerme esa paciencia y confianza que tanto aprecié. A la Dra. Edna Sánchez Castrejón, me enseñaste el valor y buen uso de la gratitud, pero lo que más quiero agradecerte es por enseñarme ese sublime nivel de disciplina dentro de un laboratorio.

Al Dr. Armando Mendoza Flores, gracias por ayudarme en la selección final de los genes a utilizar, por ayudarme a reflexionar, a crecer y por hacer aún más agradables esos días de laboratorio, gracias hermano.

Al ayudante académico Dr. Francesco Cicala que apoyó el curso de bioinformática con clases verdaderamente apasionantes con la Dra. Asunción Lago Lestón.

Al Dr. Miguel Tripp por su asesoría técnica en programación y análisis estadísticos.

Al Dr. Víctor Rico por su apoyo en el área de manejo de datos espectrales con R.

Quiero dar un agradecimiento especial para el equipo de la biblioteca de CICESE, Daniel Oviedo por facilitarme literatura científica muy difícil de conseguir y gestionar siempre tan amablemente los préstamos del acervo, a Elizabeth Áviles por ayudarme con este excelente formato en mi tesis, a Nadua Dajlala y al resto del equipo por tener siempre un espacio para mi, les agradezco y los aprecio.

A mi compañera de generación Lorena Garnica, amiga te agradezco que compartieras conmigo esta experiencia, disfruté mucho cada plática, cada risa, hasta cada tarea que realizamos juntos, por todo, gracias.

A mis compañeros de laboratorio Juan Carlos Ayala y Brianda Andrade, gracias por acompañarme en el estudio de las microalgas. Y gracias por esos momentos contando microalgas y siempre hablando de comida, un aguachile, un frappe de matcha, etc.

A mis roomies: Jeremie Bauer quiero agradecerte por recibirme y por apoyarme en mi llegada a Ensenada, gracias a ello mi maestría es una realidad. A Jaime Segovia, tu amistad ha trascendido más allá de la colaboración y el emprendimiento, gracias por apoyarme y gracias por esas “pláticas”. A las amistades en mordor, por hacer de esto un poco más... llevadero.

A mi tío Alfredo García Flores, por ser la voz de mi padre y alentarme en mi maestría, gracias tío.

A mi madre Rosalba Álvarez y mi hermana Ana María García, por siempre sentirse tan orgullosas de mi.

Y sobre todo a mi hermosa esposa Gladys Adriana Acosta Fernández, por caminar en esta vida tomada de mi mano.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español .....	i
Resumen en inglés .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Lista de figuras .....	ix
Lista de tablas .....	xiv
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Arthrospira maxima</i> .....	2
1.1.2. Usos y beneficios a la salud .....	4
1.1.3. Ficobiliproteínas .....	5
1.1.4. Fotobiología en microalgas fotosintetizadoras .....	7
1.1.5. Expresión génica en el género <i>Arthrospira</i> .....	8
1.2 Antecedentes .....	9
1.2.1 Aspectos fotobiológicos de cianobacterias .....	9
1.2.2 Aspectos transcriptómicos de cianobacterias .....	10
1.3 Justificación .....	12
1.4 Hipótesis .....	13
1.5 Objetivos .....	13
1.5.1 Objetivo general .....	13
1.5.2 Objetivos específicos .....	13
<b>Capítulo 2. Metodología .....</b>	<b>14</b>
2.1 Organismo de estudio y mantenimiento .....	14
2.2 Caracterización del crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> .....	14
2.2.1 Crecimiento y parámetros poblacionales .....	14
2.2.2 Pigmentos .....	15
2.3 Cultivos axénicos .....	16
2.3.1 Cocteles de antibióticos .....	16
2.3.1.1 Primer coctel de antibióticos .....	16
2.3.1.2 Segundo coctel de antibióticos .....	17

2.3.2	Conteo de filamentos .....	17
2.3.3	Conteo de bacterias heterótrofas .....	18
2.3.4	Fotosíntesis y pigmentos .....	18
2.3.5	Evaluación de la calidad del ARN .....	18
2.4	Efecto de la composición espectral de la luz .....	19
2.4.1	Peso seco y cenizas .....	20
2.4.2	Extracción de ficocianina .....	20
2.4.3	Composición proximal .....	21
2.4.4	Fotosíntesis y pigmentos .....	22
2.5	Estandarización de análisis de expresión génica .....	22
2.5.1	Búsqueda bibliográfica de genes de interés .....	22
2.5.2	Extracción de ARN y tratamiento con ADNasa .....	23
2.6	Análisis estadístico .....	25
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>27</b>
3.1	Caracterización del crecimiento y parámetros poblacionales .....	27
3.2	Axenización de <i>Arthrospira maxima</i> .....	28
3.2.1	Primer coctel de antibióticos .....	29
3.2.2	Segundo coctel de antibióticos .....	32
3.3	Efecto de la composición espectral de la luz .....	36
3.3.1	Crecimiento y parámetros poblacionales .....	38
3.3.2	Composición proximal .....	44
3.3.3	Fotosíntesis y pigmentos .....	44
3.3.4	Estandarización de la qPCR .....	48
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>51</b>
4.1	Caracterización del crecimiento .....	51
4.2	Axenización de los cultivos en <i>Arthrospira maxima</i> .....	53
4.2.1.	Primer coctel de antibióticos .....	54
4.2.2.	Segundo coctel de antibióticos .....	55
4.3	Efecto de la composición espectral de la luz .....	56
4.3.1	Crecimiento y parámetros poblacionales .....	56
4.3.2	Composición proximal .....	58
4.3.3	Pigmentos y fotosíntesis .....	61
4.4	Estandarización de análisis de expresión génica .....	66

	viii
4.4.1 Toma de muestra .....	66
4.4.2 Extracción .....	67
4.4.3 Purificación .....	67
4.4.4 Amplificación .....	68
4.4.5 Genes de referencia .....	69
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>	<b>70</b>
<b>Capítulo 6. Recomendaciones .....</b>	<b>72</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>73</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>86</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Arthrospira (Spirulina)</i> tomado de Ciferri, 1983 .....	3
2	Ficobilisoma y flujo de energía. (A) modelo de un ficobilisoma típico cianobacteriano como parte de un mega complejo que incluye al fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII). B) Cascada descendente de energía desde la ficoeritrina (PE), ficocianina (PC), aloficocianina (APC), la proteína hélice transmembranal de unión del ficobilisoma a la membrana del tilacoide (Lcm) y clorofila (Cl) hasta el PSII. Los números representan la emisión máxima de fluorescencia típica (F) expresada en nanómetros (nm). Tomado de Green (2019) .....	6
3	Caracterización del crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> a través de A) la evaluación de la densidad óptica (DO) a 550 nm y 680 nm, B) la densidad de filamentos ( $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ), C) la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ : divisiones día <sup>-1</sup> ) y D) variación del pH en el cultivo a través del tiempo .....	27
4	Densidad de filamentos de <i>Arthrospira maxima</i> del primer coctel de antibióticos en dosis alta [neomicina (Neo): 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomycin (Est): 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y kanamicina (Kan): 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [Neo: 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y Kan: 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis baja [Neo 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y Kan: 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías, $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD a; A>B. Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento .....	28
5	Densidad de bacterias heterotróficas del primer ensayo con tratamientos de antibióticos en dosis alta [neomicina (Neo): 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomycin (Est): 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y kanamicina (Kan): 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [Neo: 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y Kan: 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis baja [Neo 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y Kan: 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías, $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD a; A>B. Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento .....	29
6	Densidad óptica a 550 nm de longitud de onda del segundo ensayo los tratamientos de antibióticos en dosis alta [neomicina (Neo): 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomycin (Est): 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y kanamicina (Kan): 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [Neo: 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y Kan: 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis baja [Neo 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y Kan: 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías, $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD a>b>c>d>e; A>B>C>D. Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento .....	29

- 7 Evaluación de la integridad de las extracciones de ARN del primer ensayo de axenización de *Arthrospira maxima* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. E: Escalera (arriba: 100 bp y abajo: 1 Kb), Ctrl: tratamientos control (sin antibióticos), TA: tratamientos con dosis alta [neomicina (Neo): 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomocina (Est): 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina (Kan): 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], TB: tratamientos con dosis media [Neo: 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], TC: tratamientos con dosis baja [Neo 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] ..... 30
- 8 Cultivos de *Arthrospira maxima* con el segundo coctel de antibióticos en TA: dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], TB: dosis media [112.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y TC: dosis baja [75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y Ctrl: tratamiento control (sin antibiótico). Los números a lado de las claves utilizadas para los tratamientos representan el número de la repetición de cada tratamiento ..... 32
- 9 Densidad de filamentos de *Arthrospira maxima* del segundo ensayo con tratamientos de antibióticos en dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [112.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y dosis baja [75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD  $a>b>c>d>e$ ;  $A>B>C$ . Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento ..... 33
- 10 Densidad óptica a 550 nm de longitud de onda del segundo ensayo de los tratamientos de antibióticos en dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [112.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y dosis baja [75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD  $a>b>c>d$ ;  $A>B>C$ . Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento ..... 34
- 11 Densidad de bacterias heterotróficas del segundo ensayo en los tratamientos de antibióticos en dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [112.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y dosis baja [75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD  $a>b>c>d$ ;  $A>B$ . Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento ..... 34
- 12 Máxima producción fotoquímica del PSII (Fv/Fm) de los cultivos de *Arthrospira maxima* con el segundo coctel de antibióticos. TA: dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], TB: dosis media [112.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP], TC: dosis baja [75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y Ctrl: tratamiento control (sin antibiótico). los cultivos de *Arthorspira maxima* ..... 36
- 13 Composición espectral de las lámparas fluorescentes usadas para el crecimiento de los cultivos de *Arthrospira maxima* ..... 36

14	Curva de crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Letras distintas indica diferencias significativas entre tratamientos por análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba <i>a posteriori</i> Tukey HSD, $\alpha=0.05$ : a>b>c .....	37
15	Absorbancia de <i>Arthrospira maxima</i> en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos por análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba <i>a posteriori</i> Tukey HSD $\alpha=0.05$ : a>b>c .....	38
16	Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) calculada con los valores de densidad óptica de <i>Arthrospira maxima</i> mantenidos en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras indican las diferencias significativas entre tratamientos a>b .....	38
17	Tiempo de generación (Tg) calculada con los valores de densidad óptica de <i>Arthrospira maxima</i> mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras indican las diferencias significativas entre tratamientos a>b .....	39
18	Longitud de los filamentos de <i>Arthrospira maxima</i> mantenidos en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Letras iguales en minúscula indican que no hay diferencias significativas en el tiempo: a. Las letras mayúsculas indica diferencias significativas de los tratamientos: A>B .....	39
19	Valores de pH de los cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> . Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo: a>b>c>d>e>f. Las letras mayúsculas indica diferencias significativas de los tratamientos: A>B>C>D. ....	39
20	Concentración de bacterias heterotróficas en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de <i>Arthrospira maxima</i> mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo: a>b>c>d .....	40
21	Peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de <i>Arthrospira maxima</i> mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo: a>b>c .....	42

22	Composición proximal de los cultivos de <i>Arthrospira maxima</i> mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo: a>b>c>d .....	43
23	Curvas rápidas de luz de la tasa de transporte de electrones (ETR) e irradiancia fotosintéticamente activa (PAR) para los cultivos de <i>Arthrospira maxima</i> expuestos a luz blanca (●), azul (○), verde (▼) y roja (Δ). Letras distintas indica diferencias significativas entre tratamientos por análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba <i>a posteriori</i> Tukey HSD, $\alpha=0.05$ : a>b .....	44
24	Pigmentos fotosintéticos de los cultivos de <i>Arthrospira maxima</i> mantenida en cultivos con distinta calidad de luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo: a>b>c>d .....	45
25	Máxima producción fotoquímica (Fv/Fm) de <i>Arthrospira maxima</i> mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo: a>b>c .....	45
26	Curvas de amplificación y curvas de disociación por duplicado de los genes seleccionados de <i>Arthrospira maxima</i> 1) Proteína chaperona de choque térmico a 90 °C <i>HSP90</i> , 2) RuBisCO subunidad grande <i>rbcl</i> , 3) Glutamato sintasa <i>GOGAT</i> , 4) Hierro superóxido dismutasa <i>FeSOD</i> , 5) Ficocianina subunidad alpha <i>PcA</i> , 6) Proteína chaperona <i>DnaK</i> , 7) Enzima de biosíntesis de ácidos grasos <i>fabZ</i> , 8) Gen de referencia <i>16S</i> ARNr .....	47
27	Verificación de la longitud en pares de bases de los amplicones de la estandarización. Gel de agarosa 1.5X. Gen de la proteína de choque térmico ( <i>HSP90</i> ), gen de la proteína RUBisCO ( <i>rbcl</i> ), gen de la proteína glutamato sintasa ( <i>GOGAT</i> ), gen de la enzima Hierro superóxido-dismutasa ( <i>FeSOD</i> ), gen de la proteína ficocianina ( <i>PcA</i> ), proteína chaperona para la maquinaria del material genético ( <i>DnaK</i> ), desaturasa para la biosíntesis de ácidos grasos ( <i>fabZ</i> ) y gen de referencia ( <i>16S</i> ) .....	48
28	Cambios inducidos por efecto de la composición espectral de la luz en las principales rutas metabólicas de <i>Arthrospira maxima</i> . El círculo azul (●) corresponde al tratamiento con luz azul, el círculo verde (●) corresponde a luz verde, el círculo rojo (●) corresponde a luz roja y el círculo blanco (○) corresponde a luz blanca. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras dentro de los círculos indican las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos a>b>c>d. Abreviaciones: CO <sub>2</sub> : dióxido de Carbono, ETRmax: máxima tasas de transporte de electrones, Ik: Irradiancia de saturación, Fv/Fm: máximo rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II, <i>rbcl</i> : Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, <i>GOGAT</i> : Glutamato sintasa, <i>PcA</i> : Subunidad Alfa de ficocianina. Figura modificada de Sánchez-Saavedra (1994) .....	63

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Genes para evaluar el nivel de expresión de proteínas y enzimas de interés en <i>Arthrospira maxima</i> .....	22
2	Contenido de clorofila a ( $\text{mg ml}^{-1}$ ), carotenos totales ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) y tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ) (divisiones $\text{día}^{-1}$ ) de la caracterización del crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> .....	26
3	Evaluación de la calidad de la extracción de ARN de los cultivos axénicos de <i>Arthrospira maxim</i> mediante espectrofotometría en Nanodrop 2000®. Ctrl: tratamiento sin antibióticos, A1-3: tratamientos con dosis alta de antibióticos, B1-3 tratamiento con dosis intermedia de antibióticos, C1-3 tratamiento con dosis baja de antibióticos. ARN: ácido ribonucleico, 260/280: relación que indica contaminación por reactivos y 260/230: relación que indica contaminación por proteínas .....	35
4	Parámetros espectrales principales de las lámparas fluorescentes de cada tratamiento. FWHM: ancho espectral medio por sus siglas en inglés (Full Width Half Maximum: FWHM), $\Delta_{rel}$ : tasa de cambio entre la máxima irradiancia del espectro original con respecto al espectro suavizado .....	37
5	Parámetros fotosintéticos de cultivos de <i>Arthrospira maxima</i> mantenidos con diferentes composiciones espectrales de luz: Eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ), máxima tasa de transporte de electrones (ETRmax en $\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), irradiancia de saturación ( $E_k$ en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), máximo rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II (Fv/Fm). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $\alpha=0.05$ y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey HSD. Las letras indican las diferencias significativas entre tratamientos $a>b>c$ .....	44
6	Valores de Cq (ciclo de cuantificación) de los ocho genes evaluados en dilución 1:5 y dilución 1:10. Por cada gen se agregó un control negativo sin templado (NTC) .....	46
7	Registro fotográfico del efecto de las diferentes dosis del ensayo de axenización empleando el primer coctel de antibióticos .....	82
8	Composición de medio de cultivo para <i>Spirulina platensis</i> (Aiba and Ogawa 1977, Schlösser 1994) Andersen, 2005 .....	83
9	Solución de metales traza .....	83
10	Solución de vitaminas .....	83

## Capítulo 1. Introducción

---

En la actualidad muchos de los recursos alimenticios pertenecientes a los ecosistemas marinos se encuentran al límite o bien, en estado de sobreexplotación. Una alternativa para mitigar el impacto generado a los recursos marinos es la acuicultura. Una técnica desarrollada en el continente asiático con el cultivo de carpas y que ha ido evolucionando, diversificándose y tecnificándose con el paso del tiempo. Ahora existen biotecnias completamente desarrolladas para el cultivo de semilla y engorda de ostiones, mejillones, camarones, langostinos, peces de agua dulce como tilapia y trucha e inclusive peces marinos como los es el jurel y la totoaba (FAO, 2020).

El cultivo de productores primarios como macro y microalgas es de gran importancia para la acuicultura puesto que hay especies que para su cultivo en etapas adultas y juveniles dependen de las macroalgas, como en el caso de abulón (Su-Eon *et al.*, 2020) o bien, durante las primeras etapas de vida dependen de una producción continua de microalgas debido a que de ellas, se alimentan naturalmente (Holman y Malau-Aduli, 2012). Los cultivos de *Arthrospira* no son utilizados de forma tradicional como suplemento de alimento vivo, debido a la forma y tamaño de este tipo de organismo. Sin embargo, *Arthrospira* en las dietas de organismos en cultivo es un importante suplemento con efectos favorables para los organismos de cultivo y para el productor acuícola. La habilidad que las microalgas poseen para sintetizar compuestos químicos de alto valor nutritivo, ya sea absorbiendo energía solar o en cultivos mixotróficos, depende de las condiciones de cultivo (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2015). La optimización de los parámetros que regulan la función celular es un paso crítico en el aprovechamiento industrial de microalgas.

Uno de los principales objetivos de los estudios con microalgas es el de mejorar la producción de la biomasa algal y la producción de compuestos químicos de interés comercial, así como reducir los costos de producción mediante la manipulación de variables ambientales. Uno de los principales factores que deben considerarse en los cultivos de microalgas es la eficiencia fotosintética, irradiancia, la composición espectral de la luz y el fotoperiodo (Simionato *et al.*, 2011). Estos parámetros antes descritos, son cruciales para el crecimiento microalgal y la síntesis de metabolitos. Por lo tanto, la calidad de luz puede estimular adaptaciones fotosintéticas y metabólicas lo cual se puede traducir en una herramienta poderosa para la manipulación metabólica de biomasa microalgal producida de manera industrial (Patelou *et al.*, 2020).

### 1.1.1. *Arthrospira maxima*

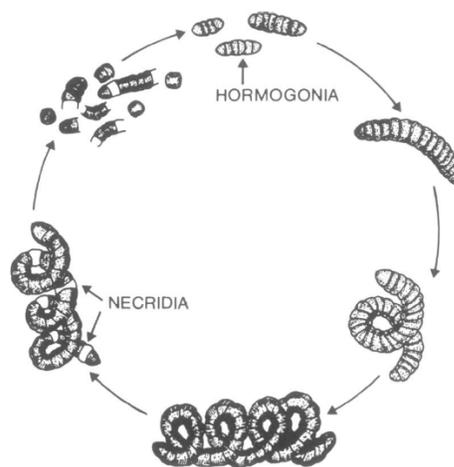
Las cianobacterias o algas verde-azules son organismos procariotas fotosintetizadores capaces de producir biomasa a partir de la luz, nutrientes y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Las cianobacterias tienen su origen hace aproximadamente 3.5 mil millones de años y son responsables de uno de los eventos más dramáticos en la historia de la evolución de la vida en la Tierra, la oxidación de la atmósfera (Huisman *et al.*, 2018). Este proceso de producción de oxígeno por parte de las cianobacterias precedió cambios en la biodiversidad celular de ese tiempo a través del proceso de evolución por endosimbiosis (Margulis, 1971). Lo anterior causó un proceso de herencia de información biológica no mendeliana (es decir, herencia horizontal) que establece que las algas verde-azules son los ancestros en común del plástido y de la maquinaria fotosintética en todas las algas y plantas eucariotas. La simbiosis planta-cianobacteria ha evolucionado en cuatro grandes taxones (las briofitas, los helechos, las cícadas y las angiospermas), por lo que el desarrollo de los morfotipos, tiende hacia la especialización de tejidos; sin embargo, ninguna de estas estructuras preexiste en ausencia del endosimbionte cianobacteriano (Chapman y Margulis, 1998).

El primer aislamiento de un miembro del género *Arthrospira* fue realizado por el naturalista francés Turpin (1827), de esta forma, estableció el género *Spirulina* para describir al microorganismo fotoautótrofo *Spiruline oscillarioide* aislado cerca de la región del Lago Chad en África. La discrepancia con el género *Spirulina* comenzó cuando Stizenberger creó el género *Arthrospira* para las cianobacterias de morfología espiral que no presentaran septos visibles dado que esta fue una característica no descrita por Turpin en su primer registro del género (Geitler, 1932). Las precisiones taxonómicas entre los géneros *Spirulina* y *Arthrospira* fueron desarrollándose con el paso del tiempo, en función del mejoramiento de las técnicas de microscopía. El género *Spirulina* incluye a aquellas cianobacterias en disposición espiral sin septos mientras que el género *Arthrospira* fue designado para aquellos organismos con paredes transversales, esta separación fue establecida en 1959 (Ciferri, 1983).

La historia de la clasificación taxonómica de los miembros del género *Arthrospira ex Spirulina* elucida que existieron discrepancias entre ambos géneros debido a limitaciones en la tecnología. Recientemente se ha propuesto al nuevo género *Limnospira* que comprende a los miembros del género *Arthrospira*, esta reclasificación tiene sustento en análisis filogenéticos a partir de la secuenciación y alineamiento del gen 16S ARNr (Nowicka-Krawczyk *et al.*, 2019). Sin embargo, este nombre no ha sido muy difundido, y esta reclasificación se encuentra aún en análisis, por lo que en este trabajo se continuará utilizando el nombre *Arthrospira maxima*.

Debido a que la morfología de las cianobacterias está fuertemente influenciada por estímulos ambientales, ha sido difícil clasificar las cianobacterias en los apropiados grupos taxonómicos. Se ha estimado que hasta un 50% de las cepas de cianobacterias de cultivos de colección han sido mal identificadas (Kumaresan *et al.*, 2017). Al dilucidar las diferencias genéticas entre *S. platensis* y *Arthrospira* sp. mostraron 100% de similitud y los genes evaluados en su estudio (16S ARNr y *cpcBA*-IGS) mostraron un coeficiente de similitud de 0.84. Sin embargo, en la actualidad se continúa publicando en manuscritos de carácter científico con el onomástico *Spirulina*, para referirse al género *Arthrospira* entre otra gran diversidad de formas de expresar el nombre de organismos pertenecientes al género *Arthrospira* (Jacquet *et al.*, 2012; Macías-Sancho *et al.*, 2014; Jinhui *et al.*, 2020).

El ciclo de vida de *Arthrospira* (*Spirulina*) es relativamente sencillo comparado con otras cianobacterias. Un tricoma (o filamento) maduro se rompe en varias partes debido a la formación de células especializadas llamadas necridios que pasan por un proceso de lisis dando lugar a la separación de células (bicóncavas o disjuntores). La fragmentación de los tricomas produce cadenas cortas de entre 2 y 6 células llamadas hormogonios, los cuales se deslizan en el medio separándose del tricoma original dando lugar a un nuevo tricoma. El hormogonio pierde los fragmentos de necridios del tricoma maduro anterior y transformando las células extremas, en una morfología redondeada debido a un adelgazamiento de la pared celular en las puntas. El número de células en el hormogonio aumenta mediante fisión binaria mientras que el citoplasma se vuelve granuloso y las células adquieren un color verde-azul brillante. Mediante este proceso, los tricomas aumentan de longitud y asumen su forma típica helicoidal (Ciferri, 1983).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima*, tomado de Ciferri, 1983.

Las cianobacterias poseen ventajas competitivas, la pared celular cianobacteriana permite una mejor hiperosmorregulación, reduciendo el gasto energético para el transporte activo de solutos (Smith *et al.*, 2008). Por lo tanto, debido al potencial que posee el género *Arthrospira* de ser cultivado en ambientes salinos y dulceacuícolas y, a las propiedades nutraceuticas del género, éste ha sido propuesto para su empleo en la industria de producción de alimento para organismos en cultivo y para mejorar la nutrición humana también.

### 1.1.2. Usos y beneficios a la salud

La especie de cianobacteria *Arthrospira maxima* es un conjunto de células dispuestas en un filamento usualmente en forma espiral y es conocida por sus propiedades nutricionales (Watanuki *et al.*, 2006). Se han realizado investigaciones sobre la utilización de *S. platensis* y *S. maxima* como aporte de alimento para consumo humano y animal. Entre los primeros usos de *Spirulina* como aporte alimenticio, destaca en los pobladores de la región de Chad en África y por los Aztecas en Tenochtitlan antes de la conquista española de “el Nuevo Mundo” (Ciferri, 1983). Estos reportes incluyen la descripción del mercado de Tenochtitlan, donde vendían una especie de panecillo con una lama verde-azul que se recogía del lago de Texcoco, el cual da un sabor parecido a queso, los Aztecas le llamaron a esta lama verde-azul “Tecuitlatl”, lo cual significa excremento de las piedras (Farrar, 1966).

Con el objetivo de resolver el problema de la malnutrición en el mundo, varios países y organizaciones internacionales han realizado esfuerzos de gran escala, como la creación de la Institución Intergubernamental para el uso de la microalga *Spirulina* Contra la Malnutrición (IIMSAM), que es un observador internacional del Consejo Económico y Social de la Organización de las Naciones Unidas. IIMSAM reconoce el potencial de *Spirulina* para alimentar la gran proporción de gente que sufre hambre en el mundo, en 1974 la microalga del género *Spirulina* fue declarado “el mejor alimento para el futuro” en la Conferencia Alimentaria de Naciones Unidas (Rehim-Abdel, 2017). Además, la Agencia Espacial Europea (ESA), así como la Administración Nacional Espacial y Aeronáutica (NASA), emplean biomasa microalgal producida por organismos del género *Spirulina* por ser un buen alimento para las misiones espaciales de largo plazo (Matufi y Choopani, 2020).

La agricultura celular es una biotecnología que utiliza microorganismos que ha tenido un desarrollo dirigido a la creación de alimentos cada vez más sustentables y más nutritivos. Un ejemplo es el cultivo de

microalgas en biorreactores de microalgas comestibles altamente nutritivas (McClements, 2019; Torres-Tiji *et al.*, 2020).

Actualmente, existe una diversidad de investigaciones relacionadas con el género *Arthrospira*, se estudia sobre su potencial como fuentes de alimento altamente nutritivo, por sus propiedades antioxidantes, inmunomodulatorias, antiinflamatorias y en la reducción de los niveles de triglicéridos y colesterol en la sangre, por mencionar algunas de las diversas propiedades de este tipo de cianobacteria (Wu *et al.*, 2016; DiNicolantonio, 2020).

Las cianobacterias del género *Spirulina* han sido utilizadas como alimento rico en proteínas en organismos en cultivo para mejorar la producción y la calidad de la carne, debido al valor nutricional y la relación costo-beneficio, es decir, su producción es rentable (Matufi y Choopani, 2020). Han sido ampliamente descritos los efectos positivos del uso de *Spirulina* en el crecimiento, la supervivencia y buenos parámetros inmunológicos en organismos en cultivo como el camarón blanco, langostinos, trucha arcoíris, carpa y tilapia (Watanuki *et al.*, 2006; Ibrahim y Ibrahim, 2013; Macías-Sancho *et al.*, 2014; Radhakrishnan *et al.*, 2014; Teimouri *et al.*, 2019).

### **1.1.3. Ficobiliproteínas**

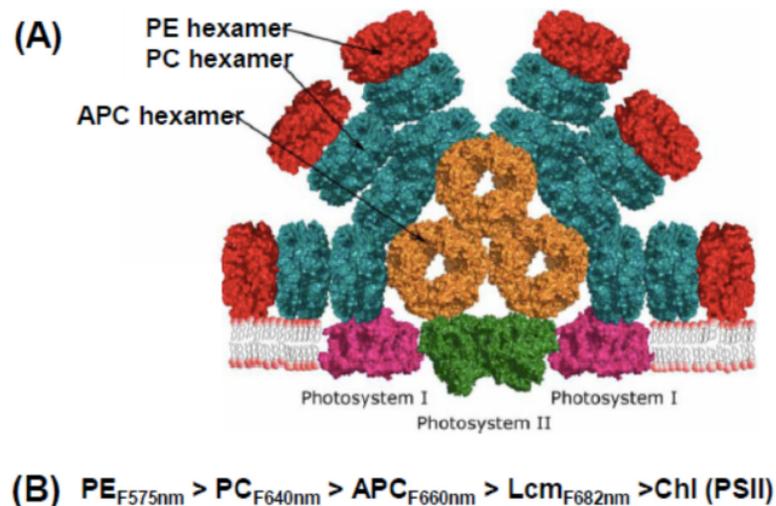
Estudios bioquímicos y fisiológicos han mostrado que las ficobiliproteínas son cromoproteínas estables, las cuales representan hasta un 50% del contenido total celular de *Spirulina* spp. (Nomsawai *et al.*, 1999). Estos pigmentos proteicos están organizados en las membranas de los tilacoides en forma de complejos llamados ficobilisomas (Pagels *et al.*, 2019).

Se pueden encontrar cuatro tipos de ficobiliproteínas en cianobacterias dependiendo de la especie: ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina y ficoeritrocianina (Pagels *et al.*, 2020). Estos compuestos son básicamente antenas moleculares necesarias para captar la luz y transformarla en energía química útil para la maquinaria fotosintética.

Independientemente de los factores ambientales, las ficobiliproteínas absorben la luz a diferentes longitudes de onda debido a pequeñas diferencias estructurales. Cada tipo de ficobiliproteína se une por medio de enlaces tioéter a miembros específicos de la diversa familia de ficobiliproteínas. Las

ficobiliproteínas fueron evolucionando en conjunto y por medio de rondas sucesivas de duplicación génica de una secuencia ancestral (Apt *et al.*, 1995; Ping *et al.*, 2002). La forma en la que las diferentes combinaciones de pigmentos y proteínas están organizadas en la estructura macromolecular compleja es lo que hace al ficobilisoma tan efectivo para absorber y transferir la luz. Los bloques proteicos necesarios para la construcción del ficobilisoma son ensamblados en pares de subunidades alfa y beta, cada bloque contiene de 1 a 3 ficobiliproteínas las cuales se asocian para formar trímeros en forma discoidal, éstos se agrupan cara a cara para formar hexámeros. Los hexámeros son ensamblados en forma de rodillos con la ayuda de moléculas de unión (Green, 2019).

La intensidad y composición espectral de la luz es el factor ambiental que más influye en la abundancia de los complejos de captura de luz, en cianobacterias estos compuestos son los ficobilisomas en cianobacterias. En respuesta a la intensidad y composición espectral de la luz, el número de ficobilisomas por célula, así como la composición celular y el tamaño de los cilindros de los ficobilisomas pueden variar (De Marsac *et al.*, 1988).



**Figura 2.** Ficobilisoma y flujo de energía. (A) modelo de un ficobilisoma típico cianobacteriano como parte de un mega complejo que incluye al fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII). B) Cascada descendente de energía desde la ficoeritrina (PE), ficocianina (PC), aloficocianina (APC), la proteína hélice transmembranal de unión del ficobilisoma a la membrana del tilacoide (Lcm) y clorofila (Cl) hasta el PSII. Los números representan la emisión máxima de fluorescencia típica (F) expresada en nanómetros (nm). Tomado de Green (2019).

Las ficobiliproteínas son los principales componentes con efecto positivo en la salud, dentro de este grupo de pigmentos, la ficocianina es considerada como un agente terapéutico potente que previene una

variedad de enfermedades (Manirafasha *et al.*, 2018). En los cultivos de cianobacterias mantenidos en los diferentes tratamientos experimentales con fines nutraceuticos, se extrae la ficocianina como componente proteico de principal interés (Prabakaran *et al.*, 2020).

#### **1.1.4. Fotobiología en microalgas fotosintetizadoras**

Las microalgas no utilizan el espectro de luz solar completo, usan únicamente una fracción de ella, en particular de los 400 a los 700 nm de longitud de onda (PAR o radiación fotosintéticamente activa por sus siglas en inglés). El aparato fotosintético no utiliza todas las longitudes de onda del espectro de la PAR, la maquinaria fotosintética absorbe únicamente las longitudes de onda que son absorbidas por los pigmentos específicos. Por lo tanto, para que la iluminación artificial pueda ser energéticamente eficiente, debe emitir no sólo energía dentro de la PAR, también debe emitir las longitudes de onda específicas que son absorbidas por los distintos tipos de pigmentos (Markou, 2014).

Las condiciones ambientales, como la cantidad de nutrientes, la temperatura del cultivo, la intensidad y la composición espectral de la luz principalmente influyen en la fisiología de las microalgas y en consecuencia modifican la composición bioquímica, el metabolismo de proteínas, aminoácidos, ácidos grasos (Uslu *et al.*, 2009), en el crecimiento, producción enzimática, fotosíntesis y rutas metabólicas de síntesis (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2020).

La estrategia de mejorar características específicas en cultivos microalgales como la acumulación intracelular de productos de alto valor comercial, o bien mejorar la tasa de crecimiento por medio de distinta composición espectral de la luz, ha proporcionado buenos resultados para la producción de biodiesel, la producción de ficocianina y otros pigmentos con alto valor comercial como la astaxantina (Katsuda *et al.*, 2004; Loong-Teo *et al.*, 2014; Sang-Hyo *et al.*, 2016).

Los cambios en las condiciones de luz en cultivos de microalgas y cianobacterias activan la síntesis metabólica de compuestos específicos e inducen un cambio en el aparato fotosintético y las rutas metabólicas (Guedes *et al.*, 2014). Los procesos de aclimatación a la luz en microalgas y cianobacterias son regulados por los diversos fotorreceptores (ficobiliproteínas) capaces de absorber la luz a través de una gran variedad de espectros (Pagels *et al.*, 2020). El tipo de aclimatación más común en cianobacterias es el tipo III, el cual consiste en una regulación de los pigmentos principalmente por la respuesta a la luz de

color verde y roja. La luz roja induce una mayor acumulación de pigmentos como ficocianina, aloficocianina y carotenoides, mientras que la luz color verde, favorece la producción de clorofila y ficoeritrina (si la especie de cianobacteria presenta estos específicos pigmentos específicos) (Golden, 1995).

Aunque las cianobacterias absorben la luz azul, esta luz es usada menos eficientemente para la fotosíntesis, respecto al efecto de otras longitudes de onda por los pigmentos fotosintéticos propios de las cianobacterias. Una explicación plausible para este fenómeno es que la luz azul no es absorbida por los ficobilisomas, por lo tanto, esto provoca una escasez en la excitación en el fotosistema II (PSII). Esta hipótesis se sustenta por estudios fotobiológicos. Sin embargo, un entendimiento integrativo de los principales cambios en la expresión génica de este fenómeno aún es escaso (Luimstra *et al.*, 2020).

#### **1.1.5. Expresión génica en el género *Arthrospira***

Aunque actualmente se conoce la composición bioquímica de *Spirulina*, la expresión de los genes codificantes de enzimas clave y otras proteínas funcionales que tienen relación con rutas metabólicas, son aún desconocidos, con excepción de las ficobiliproteínas y otros pocos genes.

La expresión de genes en miembros del género *Arthrospira* comenzó a ser de gran interés para entender la producción de proteínas (Tiboni *et al.*, 1984; Tiboni y Di Pasquale, 1987). Este interés surgió debido principalmente al alto contenido de proteínas en la biomasa de *Spirulina* (Ciferri, 1983). De la misma forma, la regulación de la luz, en la expresión de los genes de las proteínas más abundantes en *Arthrospira*, fue estudiada posteriormente (Nomsawai *et al.*, 1999).

Para la evaluación de la expresión de genes, dos técnicas han sido utilizadas principalmente. La primera es la técnica de qPCR, a través de la cual se cuantifica la expresión relativa de uno o más genes (Heid *et al.*, 1996). La otra técnica, RNA-seq, ha sido posible gracias al desarrollo de la secuenciación masiva que permite secuenciar transcriptomas completos, pudiendo explorar hasta miles de genes a la vez, así como sus niveles de expresión (Marioni *et al.*, 2008).

Las secuencias genómicas de dos cepas diferentes de *Arthrospira* fueron publicadas por primera vez por Jansen *et al.* (2010) y por Fujisawa *et al.* (2010), mientras que otras cepas de la misma especie fueron secuenciadas posteriormente en 2012 y 2014. Estas investigaciones han permitido desarrollar estudios de

la respuesta de *Arthrospira* a varias situaciones de estrés usando transcriptomas ensamblados con ayuda de estos genomas que se usaron como referencia (Depraetere *et al.*, 2015).

Los estudios de expresión génica han permitido lograr un mejor entendimiento de la respuesta de aclimatación a la variabilidad ambiental de las cianobacterias. Además, proveen información acerca de los genes y rutas que participan en el metabolismo y en el cambio en el perfil de expresión génica durante diferentes condiciones ambientales (Kumaresan *et al.*, 2017). Debido a lo anterior, se ha propuesto a los análisis transcriptómicos como fuente de información importante y útil para mejorar los bioprocesos desde un acercamiento molecular (Kumaresan *et al.*, 2018).

La investigación de los cambios en la expresión de todo el genoma puede ayudar a comprender mejor las respuestas de la célula al estrés. Los análisis desarrollados por métodos transcriptómicos para estudiar el estrés celular, sirven para identificar genes que responden a situaciones de estrés y también sirven para investigar la regulación de la expresión génica bajo condiciones particulares (Panyakampol *et al.*, 2015).

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1. Aspectos fotobiológicos de cianobacterias

Se ha evaluado en cultivos de *Spirulina maxima* con diferentes concentraciones de nitrógeno, su efecto en la actividad enzimática antioxidante, así como el contenido de ficocianina, clorofila y carotenoides, los resultados mostraron una relación directa entre la concentración de nitrógeno y la actividad antioxidante, así como la cantidad de ficocianina en *Spirulina maxima* (Özturk y Tarhan, 2011).

da Fontoura *et al.* (2020) evaluaron el efecto de diferentes composiciones espectrales y fotoperiodos en la productividad de proteínas y el perfil de aminoácidos libres (FAA) en *Spirulina* spp. Encontraron que la mejor productividad de proteína se obtuvo con LEDs de color rojo ( $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y verde con distinto tipo de fotoperiodos. En el estudio, la productividad de proteínas incrementó dos veces con luz roja y 1.6 veces con luz verde, respecto al tratamiento control provisto por luz blanca fluorescente. El tratamiento con luz verde propició un aumento de 1.8 veces en la concentración de FAA esenciales y 2.3 veces en los no esenciales, con respecto al tratamiento control. La luz LED verde mostró ser una fuente de luz

sustentable efectiva para el incremento en la productividad de proteínas y concentración de FAA en *Spirulina* spp.

La cianobacteria *Cyanobium* sp. tiene un alto valor económico y su amplio rango de aplicaciones biológicas e industriales, por lo que se evaluó el efecto de luz blanca y periodos de luz roja por 21 días ajustadas a  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La mejor estrategia para aumentar la biomasa, ficobiliproteínas y carotenoides fue el tratamiento con 10 días de luz blanca, seguidos de 11 días de luz roja. Esta estrategia aumentó la productividad de biomasa  $137.4 \pm 0.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , el contenido total de ficobiliproteínas en  $17.0 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y de carotenoides  $4.5 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respecto a lo obtenido para 21 días con luz blanca que produjo  $123.2 \pm 2.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , un contenido de ficobiliproteínas de  $9.1 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , y  $2.4 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de carotenoides totales (Pagels *et al.*, 2020).

### 1.2.2. Aspectos transcriptómicos de cianobacterias

Los primeros trabajos para conocer genes específicos del género *Spirulina* fueron en *Spirulina platensis*. Tiboni *et al.* (1984a) probaron sondas heterólogas de *Escherichia coli* para encontrar secuencias homólogas en *S. platensis* que codifican para el factor de elongación Tu, una proteína que juega un papel central en la síntesis de proteínas en bacterias. Tiboni *et al.* (1984b) clonaron los genes de las pequeñas y grandes subunidades de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato, carboxilasa de *S. platensis*. Una vez clonados dichos genes se evaluó su expresión en *Escherichia coli* y concluyeron que la cantidad de subunidades expresadas representa al menos el 10% del contenido total de proteínas. Es importante mencionar que estos estudios fueron desarrollados antes de saber que las ficobiliproteínas representan hasta un 50% del contenido total celular de *Spirulina platensis* (Nomsawai *et al.*, 1999).

Tiboni y Pasquale (1987) describieron la organización de los genes necesarios para la síntesis de proteínas como los genes ribosomales S12 y S7, los factores de elongación Tu (EF-Tu) y G (EF-G) en *Spirulina platensis*. También evaluaron la expresión génica de S12 mediante la complementación genética (hibridación) en mutantes de *E. coli*, mientras que la expresión del gen EF-Tu se encontró por la producción de la proteína en *E. coli*. Posteriormente, De Marsac *et al.* (1988) detectaron dos transcritos de ficobilisomas específicos de luz roja del operón *cpcB2A2* y codifican para polipéptidos de unión a PC2. Por otro lado, el operón *cpeBA* es transcrito específicamente cuando la cianobacteria *Calothrix* sp. es expuesta a luz verde.

El pigmento protéico ficocianina codificado en el gen *PcA*, es la principal proteína antena encargada de captar la luz, lo que la convierte en una proteína de gran relevancia para el proceso fotosintético. Esta función convierte al gen *PcA* como el más importante del género *Arthrospira* desde el enfoque de que este género se distingue por su alto valor nutricional relacionado a la gran cantidad de proteína dentro de los filamentos, donde la ficocianina es la proteína de mayor cantidad (Wang *et al.*, 2013).

El nivel de transcripción de la subunidad mayor de la proteína Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa o RuBisCO codificada en el gen *rbcL*, ha sido utilizado para evaluar el proceso fotosintético a la par de que también es posible evaluar la cantidad de carbono atmosférico fijado dentro de los centros de reacción de la maquinaria fotosintética del género *Arthrospira* (Li *et al.*, 2014).

La fuente principal de nitrógeno de las cianobacterias es asimilado fotosintéticamente, esa facultad está relacionada a la operación del sistema enzimático glutamato sintasa o GOGAT (Lara y Guerrero, 1997). Por lo tanto, esta proteína es clave al estar encargada de la fijación del nitrógeno atmosférico. Lo anterior confiere la posibilidad de emplear el nivel de expresión de esta proteína como un protocolo alternativo para evaluar la producción de proteínas desde un enfoque metabólico-molecular. La proteína catalítica Hierro-superóxido dismutasa o FeSOD, pertenece al grupo de las enzimas superóxido dismutasas. La enzima que emplea el género *Arthrospira*, utiliza hierro (Fe) como cofactor para lograr la óptima cinética enzimática. Esta proteína es comúnmente utilizada en estudios de estrés oxidativo puesto que esta enzima aporta una fuerte actividad antioxidante a *Arthrospira maxima*. La proteína chaperona de choque térmico *HSP90* es usualmente empleada para evaluar el nivel de estrés de los organismos sometidos a pruebas de reto o bioensayos. Su función es mantener el correcto plegamiento de las proteínas para que estas puedan funcionar a pesar de las condiciones adversas del ambiente (Ismail y Piercey-Normore, 2020).

La proteína codificada por el gen *DnaK*, al igual que el gen *HSP90*, tiene la misma función de proteger proteínas funcionales. Sin embargo, la proteína DnaK protege a proteínas funcionales relacionadas al sistema genético. Además, se ha encontrado en estudios previos que esta proteína es expresada diferencialmente cuando *Arthrospira platensis* es sometida a estrés salino (Wang *et al.*, 2013).

El gen *fabZ* codifica para la biosíntesis de la proteína 3R-hidroximeristoil-deshidratasa la cual es la primera enzima que participa en el ciclo de elongación para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados y debido a su función metabólica, la expresión de este gen, puede ser utilizada como un protocolo alternativo para evaluar la cantidad de ácidos grasos producidos en los filamentos de *Arthrospira maxima* (Jeanmon *et al.*, 2008).

Los niveles de expresión de diferentes genes han sido evaluados para los miembros del género *Arthrospira* utilizando únicamente el gen 16S ARNr como gen de referencia.

Hasta el momento no se tiene conocimiento de algún otro estudio donde se utilice otro gen constitutivo para ser tomado como referencia en investigaciones de cuantificación de los niveles de expresión génica (Jeamton *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013; Ismaiel y Piercey-Normore, 2020).

A partir del desarrollo de tecnologías de secuenciación masiva el estudio de la expresión génica en *Spirulina* se vio revolucionada con la técnica de RNA-seq (Wang *et al.*, 2009). Con esta técnica ha sido posible analizar los cambios en el crecimiento y la diferencia en la expresión de moléculas clave de *A. platensis* durante cultivos en privación de sulfato (Kumaresan *et al.*, 2017).

A pesar de estos trabajos, sólo se ha evaluado el perfil transcriptómico de *A. platensis* con ensamble *de novo* y las rutas metabólicas involucradas, sin someter al organismo a tratamientos específicos. Los autores concentran su estudio en la identificación de genes relacionados con las principales rutas metabólicas.

Los resultados obtenidos con los análisis de expresión de genes son relevantes en estudios realizados con la utilización del dióxido de carbono, la fijación del nitrógeno, producción de biocombustibles, pigmentos y biosíntesis de metabolitos secundarios y el mecanismo antioxidante de *A. platensis* (Kumaresan *et al.*, 2018).

### 1.3 Justificación

Los microorganismos, como las cianobacterias, son organismos que pueden aportar soluciones a los objetivos para el desarrollo sostenible establecidos por la FAO (FAO, 2015). *Arthrospira (Spirulina) maxima* es una cianobacteria con el mejor potencial biotecnológico para aportar soluciones a estos objetivos descritos por la FAO, a saber, “Hambre Cero” y “Salud y Bienestar”; debido a su alto valor nutricional el cual radica en el gran contenido de proteínas, el perfil de aminoácidos de sus proteínas y su efecto antioxidante en los organismos que la consumen.

En este estudio se aportará conocimiento respecto a la respuesta de *Arthrospira maxima* cuando se encuentra expuesta a la azul, verde, blanca y roja. La respuesta metabólica de *Arthrospira maxima* será

estudiada desde un enfoque fisiológico, a través del análisis de las variables de respuesta como el crecimiento, la producción de proteínas, carbohidratos, lípidos, eficiencia fotosintética y producción de pigmentos fotosintéticos de los cuales se espera obtener información valiosa que pueda ayudar a comprender los cambios inducidos por efecto de la composición espectral de la luz en cultivos de *Arthrospira maxima*.

## 1.4 Hipótesis

El crecimiento y la producción de proteínas en *Arthrospira maxima* aumentarán al exponerla a luz roja y verde con relación a la luz blanca.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los diferentes tipos de luz en la composición proximal y en la estandarización de los procedimientos para la expresión de genes asociados a las principales rutas metabólicas en los cultivos de *Arthrospira maxima*.

### 1.5.2. Objetivos específicos

- Obtener cultivos axénicos de *Arthrospira maxima* mediante el uso de antibióticos.
- Conocer los cambios en la composición proximal y fotosíntesis de cultivos axénicos de *Arthrospira maxima* expuestos a la luz verde, blanca, roja y azul.
- Estandarizar los protocolos necesarios para evaluar la expresión diferencial de los genes relacionados con el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como los genes involucrados con la producción de pigmentos con efecto antioxidante y los genes asociados a estrés en *Arthrospira maxima* expuesta a la luz blanca, verde, roja y azul.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Organismo de estudio y mantenimiento

La cepa utilizada fue *Arthrospira (Spirulina) maxima* aislada del Lago de Texcoco en el Estado de México, es parte de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Algas del CICESE. Esta cepa provino de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Se realizaron cultivos monoespecíficos de *Arthrospira maxima* y se mantuvieron en sistemas por lotes en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio para *Spirulina* (Andersen, 2005). Las condiciones de mantenimiento de los cultivos fueron: temperatura de  $20 \pm 1$  °C y una irradiancia continua de  $50 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por lámparas fluorescentes de luz fría (Philips F40T12/DX). La cepa recibió recambios semanales de medio y cada día se dio agitación manual. La irradiancia se midió por medio de un radiómetro QSL-100 Biospherical Instruments Inc. provisto con un sensor  $4 \pi$ .

### 2.2 Caracterización del crecimiento de *Arthrospira maxima*

Se caracterizó el crecimiento de *Arthrospira maxima* al tener cultivos por triplicado en medio específico para *Spirulina* (Andersen, 2005) en Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio de cultivo. Cada día se evaluó el crecimiento, el pH y el contenido de pigmentos por los métodos descritos a continuación.

#### 2.2.1 Crecimiento y parámetros poblacionales

En los cultivos se evaluó diario la concentración de células por medio de mediciones de la densidad óptica (D.O.) con un espectrofotómetro marca HACH DR 6000 a una longitud de onda de 550 y 680 nm. Además, se midió la abundancia de células mediante el conteo de filamentos con la ayuda de un microscopio Olympus CX-31 y un hematocitómetro. La abundancia de células o densidad de filamentos fue calculada al usar la fórmula descrita en la ecuación (1):

$$D = N * 10^4 * FD \quad (1)$$

En donde D es la abundancia de filamentos por ml, N es el número promedio de filamentos contados en la cámara de Neubauer y FD es el factor de dilución de la muestra.

La tasa de crecimiento específica o velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), se calculó con la ecuación (2):

$$\mu = \frac{(\log_2 N_2) - (\log_2 N_1)}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

En donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento específica,  $N_2$  es la abundancia de filamentos al tiempo 2 y  $N_1$  es la abundancia de filamentos al tiempo 1.  $\log_2$  corresponde al logaritmo base dos de los datos de la concentración de filamentos (Fogg y Thake, 1987).

El tiempo de generación o tiempo de duplicación es la cantidad de tiempo necesaria para que una población de células duplique su cantidad y que fue evaluada con la ecuación (3):

$$t_g = \frac{1}{\mu} \quad (3)$$

En donde  $t_g$  es el tiempo de generación y  $\mu$  es la tasa de crecimiento específica calculada con un logaritmo de base dos (ecuación 2).

El tamaño de los filamentos de *A. maxima* fue evaluado midiendo el largo y ancho de 30 filamentos de cada condición experimental. Las mediciones del tamaño se realizaron mediante un microscopio compuesto marca Olympus CX-31 y un software de análisis de imagen "Image Pro-Discovery Pro" versión 5.1.

### 2.2.2 Pigmentos

Para evaluar la clorofila y los carotenos se utilizó una alícuota de 5 ml de cultivo para evaluar el contenido de pigmentos, para lo cual el volumen de la muestra se pasó a través de un filtro de fibra de vidrio GF/C marca Whatman de 12 mm de diámetro y de 1  $\mu$ m de apertura de poro. La extracción de pigmentos de la

muestra se realizó con acetona al 90% y al utilizar las ecuaciones para cada tipo de pigmento según Parsons *et al.* (1984). Para la cuantificación se empleó un espectrofotómetro marca HACH DR 6000 y se usaron las ecuaciones descritas por Jeffrey y Humphrey (1975).

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) = -0.08 A_{630} - 1.54 A_{647} + 11.85 A_{664} \quad (4)$$

$$\text{Carotenos } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 7.6(A_{480} - 1.49A_{510}) \quad (5)$$

## 2.3 Cultivos Axénicos

### 2.3.1 Cocteles de antibióticos

#### 2.3.1.1 Primer coctel de antibióticos

Para obtener cultivos axenicos de *A. maxima* se utilizó un volumen de 10 ml de cultivo obtenido de un inóculo en la fase exponencial media de crecimiento. Se realizó un bioensayo por siete días donde se utilizó un coctel de antibióticos constituido por ampicilina, kanamicina, neomicina y estreptomina en tres concentraciones diferentes modificadas de Tapia-Gallardo (2019), las concentraciones fueron:

- a) El primer tratamiento de dosis alta consistió en: 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina, 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de neomicina y 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomina.
- b) El segundo tratamiento con dosis media tuvo la mitad de la dosis descrita en el inciso "a" y consistió de: 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina, 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de neomicina y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomina.
- c) El último tratamiento con dosis baja estuvo compuesto de 31.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina, 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de neomicina y 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomina.
- d) Tratamiento control, sin la adición de antibióticos.

### 2.3.1.2 Segundo coctel de antibióticos

Para obtener los cultivos axénicos de *A. maxima* se utilizó un volumen de cultivo como ya se ha descrito en la sección 2.3.1. Se realizó un bioensayo durante siete días donde se utilizó un coctel de antibióticos en tres concentraciones diferentes constituido por ampicilina, cefoxitina y penicilina G:

- a) El primer tratamiento de dosis alta consistió en: ampicilina, cefoxitina y penicilina G cada uno a  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ .
- b) El segundo tratamiento con dosis media consistió en: ampicilina, cefoxitina y penicilina G cada uno a  $112.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ .
- c) El último tratamiento con dosis baja estuvo compuesto de ampicilina, cefoxitina y penicilina G cada uno a  $75.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ .
- d) Tratamiento control, sin la adición de antibióticos.

Cada tratamiento del primer y segundo coctel de antibióticos se realizó por triplicado y se mantuvo en tubos de vidrio de 15 ml con 9.5 ml de cultivo obtenido de un inóculo en la fase exponencial media de crecimiento.

A continuación, se describen los procedimientos utilizados para el análisis de las muestras colectadas de cada tratamiento experimental en los ensayos de axenización:

### 2.3.2 Conteo de filamentos

El conteo de la concentración de *Arthrospira maxima* se estimó mediante el conteo de filamentos como ya descrito en la sección 2.2.1 y el contenido de bacterias heterotróficas se cuantificó como se describe a continuación.

### 2.3.3 Conteo de bacterias heterótrofas

Se tomó una submuestra del medio de cultivo de cada condición experimental para conocer la cantidad de bacterias heterotróficas por unidad de volumen en los cultivos. Se realizaron diluciones seriales hasta  $10^{-4}$  para cada tratamiento con el propósito de asegurar que la evaluación de la concentración de bacterias en el medio pudiera ser contabilizada. Se requirió de suero fisiológico (8.9 g de NaCl L<sup>-1</sup>) para hacer las diluciones para el conteo de bacterias. En condiciones de esterilidad, se tomó 0.1 ml de cada dilución para realizar la inoculación de la muestra en cajas Petri con 15 ml de medio Zobell (Zobell, 1941) siguiendo el procedimiento descrito por Murray y Niles (1981). Las cajas Petri se incubaron en una miniincubadora VWR a 28 °C por 48 horas. Se realizó el conteo de las colonias bacterianas que fueron expresadas en unidades formadoras de colonias por cada ml (UFC ml<sup>-1</sup>).

### 2.3.4 Fotosíntesis y pigmentos

Para medir la actividad fotosintética, fue necesario mantener las muestras en completa oscuridad por 15 min para después realizar las mediciones con un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (PAM) (Walz, Junior PAM).

Se obtuvieron las curvas de luz de cada tratamiento experimental y acto seguido, se determinaron los parámetros fotosintéticos; rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), máxima tasa de electrones (ETR<sub>max</sub>), eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) e irradiancia de saturación lumínica (Ik), esto fue posible a partir del cálculo de la absorptancia mediante el programa Solver (López-Figueroa, 2018).

El contenido de pigmentos se evaluó con el procedimiento ya descrito en la sección 2.2.2.

### 2.3.5 Evaluación de la calidad del ARN

Se realizó un análisis de la cantidad, integridad y pureza de ARN de los cultivos mantenidos en los tratamientos con antibióticos. Se realizó la extracción de ARN mediante el kit comercial RNeasy Plant mini

kit Qiagen. Para evaluar la cantidad y pureza de la extracción del ácido nucleico, se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la extracción y fue evaluado por espectrofotometría con un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para evaluar la integridad de la extracción de ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 3  $\mu\text{L}$  de cada extracción a 80 Volts por 60 min después, se observó la migración de los productos a través del gel en un fotodocumentador BIO-RAD Doc XR- max.

## 2.4 Efecto de la composición espectral de la luz

Se implementaron cultivos de *Arthrospira maxima* por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500-mL con 300 mL de medio Andersen (2005). Se tomaron alícuotas de los cultivos mantenidos en cada condición experimental durante la fase exponencial y estacionaria. Las condiciones ambientales de mantenimiento fueron similares a las descritas en la sección 2.1 exceptuando por la iluminación. La iluminación para los cultivos fue provista por lámparas fluorescentes de 40W de luz blanca (Philips F40T12/Dx) y que fue considerada como tratamiento control, los tratamientos experimentales fueron con iluminación artificial fluorescente color azul (General Electric F40B), iluminación artificial fluorescente verde (General Electric F40G), luz artificial de color rojo (Industrial F40T12/R).

El espectro de la luz fue medido con un espectrorradiómetro International Light ILT950 con 1 nm de resolución en el espectro visible y sus extremos no visibles (350 a 1200 nm).

La irradiancia para todos los tipos de iluminación fue continua a 50  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y fue medida en la parte central de la base del matraz Erlenmeyer con 500 mL de cultivo con un radiómetro QSL-100 marca Biospherical Instruments Inc. Se utilizaron las funciones del paquete Photobiology desarrollado por Aphalo (2015) para el software R (Ihaka y Gentleman, 1999) versión 4.0.5 para la realización de todos los cálculos fotobiológicos.

De las lecturas obtenidas con el espectrorradiómetro, se realizó una eliminación manualmente del alto ruido electromagnético seguido de una suavización de las curvas mediante el método numérico de súper suavizado de Friedman (1984) con fuerza de 1, excepto para el espectro de luz blanca que requirió fuerza 2 de suavizado. Una vez suavizados los espectros de luz se procedió a recortar los espectros a un rango desde 300 nm hasta los 800 nm de longitud de onda.

Se realizó un análisis de los picos espectrales donde se evaluó la variación en la irradiancia máxima de cada pico espectral para ello, se utilizó la ecuación número 4.

$$\Delta_{rel} = \left(1 - (I_{max} - \hat{I}_{max})\right) * 100 \quad (4)$$

Donde  $\Delta_{rel}$  es la diferencia relativa de la irradiancia del pico máximo de los datos suavizados y no suavizados,  $I_{max}$  es la irradiancia máxima de los datos originales (lecturas obtenidas con el espectrorradiómetro) y  $\hat{I}_{max}$  es la irradiancia máxima de los datos tratados (datos después del proceso de suavizado).

Se identificó la longitud de onda del pico del espectro de cada lámpara mediante un algoritmo diseñado para buscar el pico global de un espectro y dentro de las funciones del paquete Photobiology de la *suite* “R for photobiology” (Aphalo, 2015). La amplitud o rango en nanómetros de las longitudes de onda que abarca la irradiancia media del pico global de cada espectro.

#### **2.4.1 Peso seco y cenizas**

Para cada condición experimental se tomaron muestras de 15 ml y se pasaron por filtros de fibra de vidrio GF/C marca Whatman de 47 mm de diámetro y de 1  $\mu$ m de apertura de poro.

Previamente, los filtros se lavaron, se incineraron en una mufla a 490 °C y se pesaron. Los filtros con muestra fueron lavados con 15 ml de formiato de amonio al 3% y se colocaron en una estufa a 60 °C hasta obtener valores de peso constante entre 48 a 72h, el cual fue el peso seco total de la muestra (PST).

Los filtros se incineraron en la mufla a 490 °C por 12 h para cuantificar el peso de las cenizas (PC), y para obtener el peso seco orgánico (PSO) se restó el peso seco total menos el peso de las cenizas.

#### **2.4.2 Extracción de ficocianina**

Para la determinación de ficocianina, se filtró una alícuota de 5 ml de cultivo de cada condición experimental por filtros de fibra de vidrio GF/C marca Whatman de 24 mm y de 1  $\mu$ m de apertura de poro.

Los filtros con muestra fueron resuspendidos en solución tampón 50 mM (pH 6.8) y la extracción se realizó después de congelar y descongelar con nitrógeno líquido la muestra en 5 repeticiones. La solución de extracción de las muestras fue centrifugada a 5,000 rpm (4,480 g) por 10 min y el sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de ficocianina por métodos espectrofotométricos.

La concentración de ficocianina fue medida acorde a la ecuación (4) descrita por (Markou, 2014).

$$Ficocianina (mg l^{-1}) = \frac{DO_{615} - 0.474 * DO_{652}}{5.34} \quad (4)$$

Donde  $DO_{615}$  y  $DO_{652}$  son las densidades ópticas obtenidas en las longitudes de onda de 615 y 652 nm respectivamente.

### 2.4.3 Composición proximal

Durante la fase exponencial de crecimiento de los cultivos, se tomaron muestras de para el análisis de la composición proximal. Para cada caso, se tomó una alícuota de un volumen de 10 ml, el cual se pasó por filtros de fibra de vidrio GF/C marca Whatman de 24 mm y de 1  $\mu$ m de apertura de poro.

Una vez filtradas las muestras se procedió a almacenarlas a -20 °C hasta su posterior análisis de proteínas, lípidos y carbohidratos.

- (A) La extracción de proteínas se realizó por el método descrito por Malara y Charra (1972a). Para la cuantificación se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951) el cual mide la intensidad del color obtenido por el reactivo de Folin-Ciocalteau mediante espectrofotometría. La curva de calibración para las proteínas se realizó con suero de albúmina de bovino (98%) marca Sigma®

(cat. A7906) como estándar.

- (B) Para la extracción de carbohidratos se usó ácido sulfúrico 0.5 N acorde a lo descrito por Whyte (1987).

Para la cuantificación de carbohidratos se empleó fenol al 5% y ácido sulfúrico según lo descrito por el método de Dubois *et al.* (1956) y Malara y Charra (1972). Se realizó una curva de calibración con una solución de glucosa al 99% marca Sigma® (cat. 68270) como estándar.

- (C) Para la extracción de lípidos se utilizó una mezcla de cloroformo-metanol-agua según lo descrito por el método de Blight y Dyer (1959) y modificado por Chiaverini (1972). Para la cuantificación se siguió el procedimiento descrito por Pande *et al.* (1963). Se construyó una curva de calibración utilizando como estándar, una solución de tripalmitina (C16:0) al 99% marca Sigma® (cat. T5880).

#### **2.4.4 Fotosíntesis y pigmentos**

Para cada condición experimental se evaluó la respuesta fotosintética y el contenido de pigmentos como se describió en la sección 2.2.2 y 2.3.4.

### **2.5 Estandarización de análisis de expresión génica**

#### **2.5.1 Búsqueda bibliográfica de genes de interés**

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes que codifican para enzimas clave en procesos metabólicos como la fotosíntesis, fijación del carbono, metabolismo del nitrógeno, biosíntesis de ácidos grasos, respuesta antioxidante, proteínas chaperonas involucradas en respuesta al estrés fisiológico, o bien, genes que codifican para un producto de interés como la subunidad alfa de la ficocianina.

Asimismo, se realizó una búsqueda en diversos estudios para la utilización del gen que fue empleado como gen de referencia. De cada gen, se investigaron las secuencias de los cebadores (primers), condiciones de reacción de amplificación y tamaño esperado de amplicon (Tabla 1).

**Tabla 1.** Genes para evaluar el nivel de expresión de proteínas y enzimas de interés en *Arthrospira maxima*.

Nombre del Gen	ID del Primer	Secuencia de Iniciadores	Amplicon (pb)	Temp. de alineamiento (Tm °C)	Función biológica	Referencia
Subunidad Alfa de ficocianina ( <i>A. maxima</i> )	PcA-F	GTTTCTATCGCTGATTCCC	194	58	Proteína antena fotosintética	Wang <i>et al.</i> , 2013.
	PcA-R	TTAGGTCCCTGCATTTGG				
Chaperona molecular <i>DnaK</i> ( <i>A. maxima</i> )	DnaK-F	ACGGTGAACCCTGATGAA	240	58	Proteína Chaperona	
	DnaK-R	ACCCTGGAGAACGTGAAT				
(3R)-hydroxymyristoyl- [acyl-carrier-protein]-dehydratase ( <i>fabZ</i> )	fabZ-F	ATGTCCACAGTTAACACGAC	N/A	58	Enzima clave para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados	Jeamton <i>et al.</i> , 2008
	fabZ-R	TTAGTCTACCAGGGAAAACA				
Proteína de Choque Térmico 90 ( <i>HSP90</i> )	HSP90Sp_F	GACCGTACTTGAACAGGGAAC	194	60	Resistencia térmica	Ismail y Piercey-Normore, 2020.
	HSP90Sp_R	TGGTAATTTGTGGGTTGCTGA				
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa ( <i>rbcl</i> )	rbcl_Sp_F	GACTTCACCAAAGACGACGA	158	60	Fotosíntesis y fijación de Carbono	
	rbcl_Sp_R	ATTTCTTCGAGGTGGGGGC				
Glutamato Sintasa ( <i>GOGAT</i> )	Glut_Sp_F	TGCGGTTACTGGGGCATAACG	145	60	Fijación del Nitrógeno	
	Glut_Sp_R	TCGCTGTTATTGGCATCCACA				
Hierro superóxido dismutasa <i>FeSOD</i>	SgF1	TGGCTGATATGTCCCTGGAAG	148	60	Antioxidante	
	SgR1	GCTCCTGTAGGTTGACCACCA				
16S	Ap16S-F1	CGTAAACCTCTCCTCAGTTCAG	99	58	Control interno	Kumaresan <i>et al.</i> , 2018
	Ap16S-R2	GAACGGATTCACCGCAGTAT				

### 2.5.2 Extracción de ARN, tratamiento con ADNasa

Se realizó la estandarización de la extracción de ARN a partir de la biomasa de *Arthrospira maxima* donde se probó una combinación de diferentes cantidades de células en fase exponencial, 5 ml ( $6.5 \times 10^6$  filamentos  $\text{ml}^{-1}$ ) y 1.5 ml ( $1.95 \times 10^6$  filamentos  $\text{ml}^{-1}$ ). La muestra fue inmediatamente colocada en nitrógeno líquido y fue almacenada a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento posterior. Adicionalmente, se probó

realizar la lisis celular mediante dos tipos diferentes de perlas de zirconia marca BioSpec No. Cat. 11079110z. Se probaron 100 mg de perlas con diámetro <1.00 mm y se probaron 100 mg de perlas de 1 mm de diámetro.

Una vez seleccionada la cantidad de biomasa y el diámetro óptimo de perlas de zirconia, se procedió a realizar la estandarización con DNAsa. En una reacción de 30  $\mu$ l con 3  $\mu$ g de material genético de *Arthrospira maxima*, se agregó la solución amortiguadora de la reacción a una concentración de 1X y se agregaron 3 unidades de enzima ADNasa (RQI, DNase, Promega). Para la estandarización de protocolos de expresión génica se tomó una muestra a partir del cultivo de *Arthrospira maxima* en fase exponencial y se cosecharon 5 ml mediante centrifugación a 4000 g por 15 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5810-R, se descartó el sobrenadante e inmediatamente la pastilla de biomasa fue transportada en nitrógeno líquido y fue almacenada a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

El ARN total fue extraído de las células usando el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 74904) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, finalmente la extracción de ARN fue resuspendida en 12  $\mu$ l de agua libre de RNAsas.

La cuantificación de la concentración de ARN, así como la evaluación de su pureza, se realizó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, Wilmington, DE, EUA) donde el umbral para la relación A260/280, que determinó contaminación por proteínas, y la relación A260/230, que determinó contaminación por fenoles u otros solutos, fue de 2.0 y 2.2 respectivamente. Posteriormente, la integridad del ARN fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.5% cargando el material genético con 2  $\mu$ l de amortiguador de carga preparado con GelRed y 1  $\mu$ l de cada muestra. Las muestras y el marcador de peso molecular de 1 kb migraron a través del gel dentro de una cámara de electroforesis (Bio-Rad®) a 80 volts por 60 min y 400 mAmp.

Se realizó un procedimiento adicional de purificación con enzima ADNasa. Para ello, se tomaron 1.5  $\mu$ g de cada extracción de ARN, los cuales fueron tratados con 1.5 unidades de ADNasa (RQI, DNase, Promega) con el objetivo de remover la presencia de ADN genómico (ADNg). Para corroborar que el tratamiento con ADNasa fue adecuado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se observó la migración de las bandas 23S y 16S ribosomales procarióticos y posteriormente se realizó una PCR de punto final en un termociclador MiniAmp Applied Biosystems™ utilizando los cebadores del gen de referencia (16S) utilizando ADN complementario (ADNc) como control positivo. Para cada reacción de 15  $\mu$ l se emplearon las siguientes concentraciones de cada componente: amortiguador de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5

mM, dNTP mezcla 0.2 mM. oligo sentido 0.2  $\mu$ M, oligo antisentido 0.2  $\mu$ M, Taq polimerasa 0.4 U. La amplificación se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 15 s y una extensión final de 72 °C por 3 min. Se verificó la presencia de los productos de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% empleando 2  $\mu$ l de solución amortiguadora de carga 6X por cada 5  $\mu$ l de cada producto de PCR.

Una vez que se verificó la pureza del ARN, se realizó la transcripción reversa con el kit ImProm-II® Reverse Transcription System. Para sintetizar ADNc se tomaron 750 ng de ARN tratado con ADNasa acorde a las instrucciones del fabricante.

## 2.6 Análisis estadístico

Para todos los datos obtenidos se realizaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilks), y homogeneidad de varianzas (Barlett), se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y la prueba *a posteriori* de Dunn para los conjuntos de datos que no pudieron cumplir los supuestos paramétricos estadísticos. En los casos donde se pudo demostrar homocedasticidad y normalidad en los datos se procedió a realizar análisis de varianza paramétrico.

En los ensayos de axenización, las diferencias en el crecimiento de bacterias heterotróficas, la cantidad de filamentos y la densidad óptica, fueron evaluadas para cada caso, por un análisis de varianza de dos vías, esto es, para cada fecha de medición con los distintos tratamientos experimentales. Para obtener los grupos homogéneos se realizó la prueba de Diferencias Honestamente Significativas (HSD) de Tukey.

El resultado de la prueba *a posteriori* fue comparado con el resultado de la prueba Bonferroni y la prueba de Mínimas Diferencias Significativas (LSD por sus siglas en inglés). Se eligió la prueba *a posteriori* que mostró mejor constancia entre los resultados obtenidos. Los suscritos de los grupos homogéneos fueron obtenidos con la librería "MultCompView" de R.

Las diferencias en el conteo de células de filamentos, la tasa de crecimiento, el tiempo de generación, tamaño de filamentos, PST, PC, PSO, y de la composición proximal (proteínas, carbohidratos y lípidos) fueron comparados para cada caso por medio de una prueba de análisis de varianza de una vía.

Se realizó un análisis de covarianza de las curvas de crecimiento de la densidad de filamentos y de la densidad óptica de los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenida con diferentes composiciones espectrales de la luz y se realizó una prueba *a posteriori* para evaluar las diferencias entre grupos.

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el software R® (Ihaka y Gentleman, 1999) versión 3.6.1 y se consideró un valor de significancia de 0.05.

## Capítulo 3. Resultados

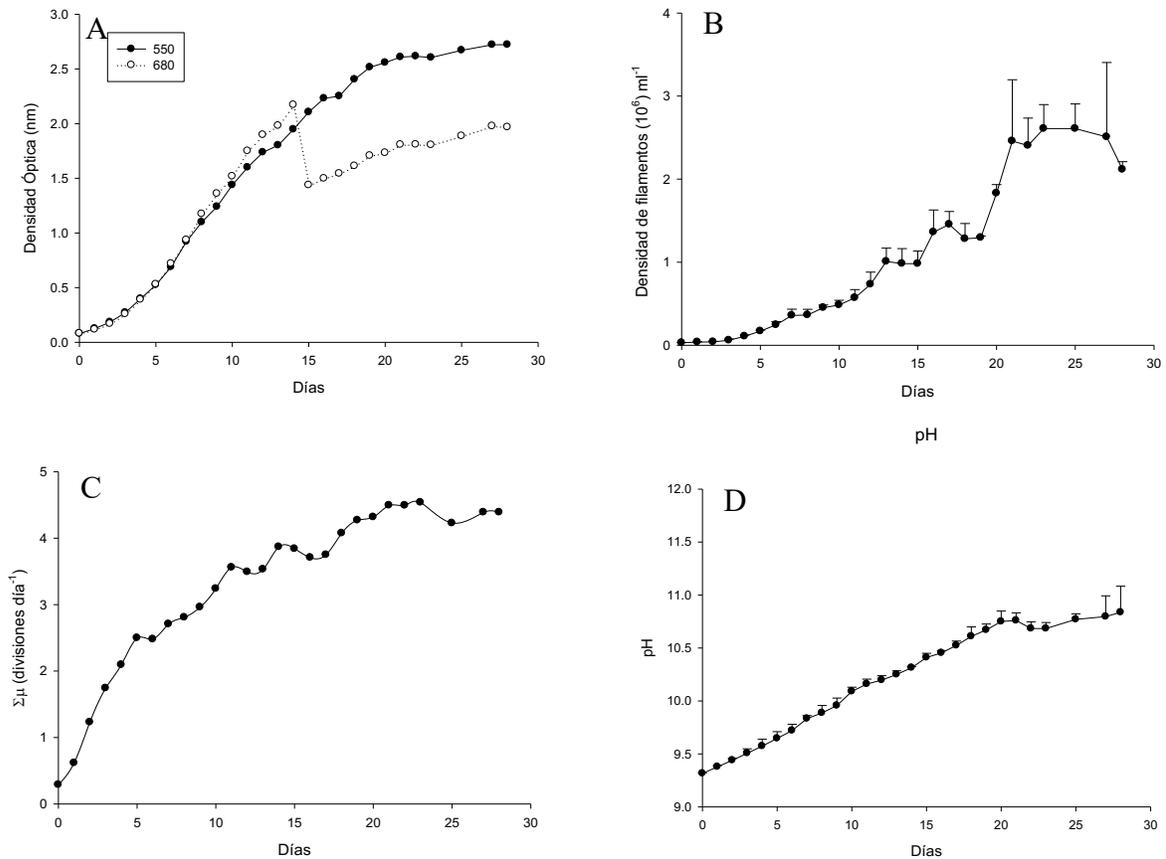
### 3.1 Caracterización del crecimiento y parámetros poblacionales

Las curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad óptica mostraron distintas tendencias al ser evaluadas a 550 nm y 680 nm (Figura 3). La fase estacionaria se alcanzó al día 22 con un inóculo de  $30 \times 10^3$  filamentos  $\text{ml}^{-1}$ . Los mayores valores de la tasa de crecimiento se obtuvieron los días 3 y 4 (Tabla 2). A partir de esta determinación se utilizó la longitud de onda de 550 nm para evaluar la densidad óptica de los cultivos de *Arthrospira maxima*.

La tasa de crecimiento obtenida con el número de filamentos a través del tiempo (expresada en términos de la integración del área bajo la curva fue de utilidad para determinar el momento en el que *Arthrospira maxima* dejó de crecer. La cantidad de clorofila a mostró una relación directamente proporcional con el tiempo (Tabla 2). Los pigmentos accesorios, los carotenos, representaron el 20 y 23% de los pigmentos totales.

**Tabla 2.** Contenido de clorofila a (Cl-a,  $\text{mg ml}^{-1}$ ), carotenos totales ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) y tasa de crecimiento por día ( $\mu$ ) divisiones  $\text{día}^{-1}$ ) de la caracterización del crecimiento de *Arthrospira maxima*.

Tiempo (d)	Cl-a	Carotenos	$\mu$	$\Sigma\mu$
0	0.30 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.04	0.28
1	0.50 $\pm$ 0.16	0.14 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.06	0.61
2	0.80 $\pm$ 0.14	0.22 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.44	1.22
3	0.92 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.39	1.74
4	1.95 $\pm$ 0.17	0.47 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.16	2.09
5	3.57 $\pm$ 0.19	0.90 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.20	2.49
6	4.43 $\pm$ 0.25	1.07 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.03	2.48
7	6.44 $\pm$ 0.22	1.56 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.03	2.70
8	8.42 $\pm$ 1.43	2.16 $\pm$ 0.35	0.23 $\pm$ 0.12	2.80
9	9.43 $\pm$ 0.25	1.82 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.03	2.96
10	11.93 $\pm$ 0.64	2.92 $\pm$ 0.15	0.15 $\pm$ 0.09	3.23
11	11.36 $\pm$ 2.01	2.54 $\pm$ 0.56	0.28 $\pm$ 0.04	3.56



**Figura 3.** Caracterización del crecimiento de *Arthrospira maxima* a través de A) la evaluación de la densidad óptica (DO) a 550 nm y 680 nm, B) la densidad de filamentos ( $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ), C) la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ : divisiones  $\text{día}^{-1}$ ) y D) variación del pH en el cultivo a través del tiempo.

## 3.2. Axenización de *Arthrospira maxima*

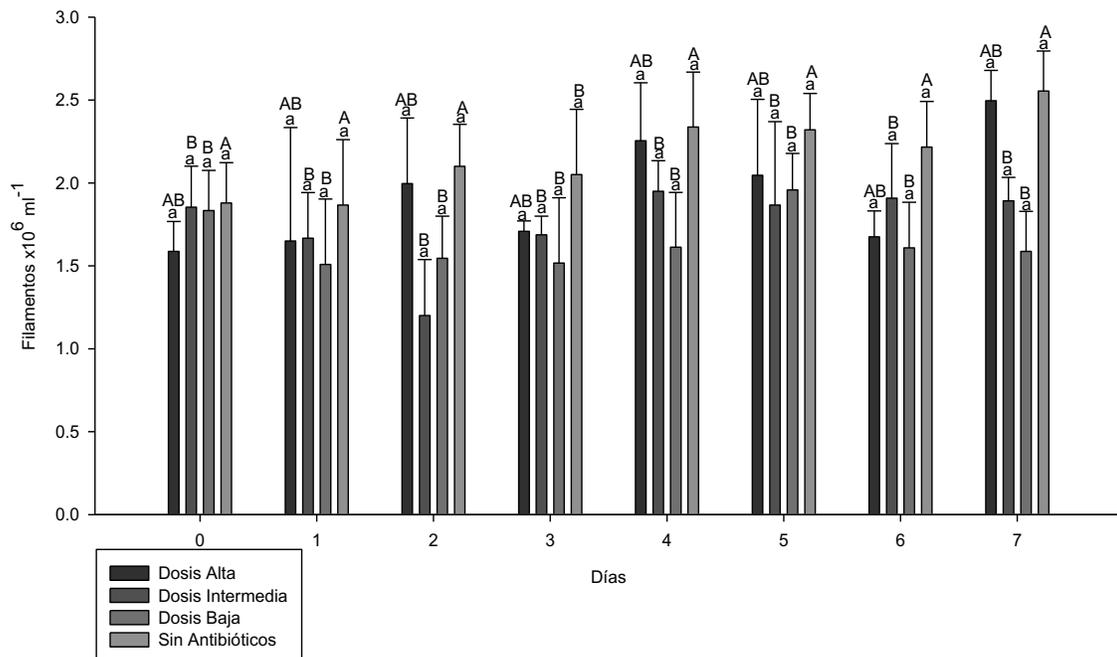
### 3.2.1 Primer coctel de antibióticos

La cantidad de filamentos de *Arthrospira maxima* presentó diferencias significativas entre los días del ensayo ( $P < 0.05$ ), entre tratamientos ( $P < 0.05$ ) y con interacción significativa entre ambas variables ( $P < 0.05$ ). El tratamiento sin antibióticos fue el que presentó mayor densidad de filamentos y los tratamientos que presentaron significativamente menor densidad de filamentos fueron con dosis baja e intermedia. Se probó que hubo supervivencia de los filamentos hasta el último día del bioensayo, algo no esperado para un ensayo de axenización con cianobacterias (Figura 4).

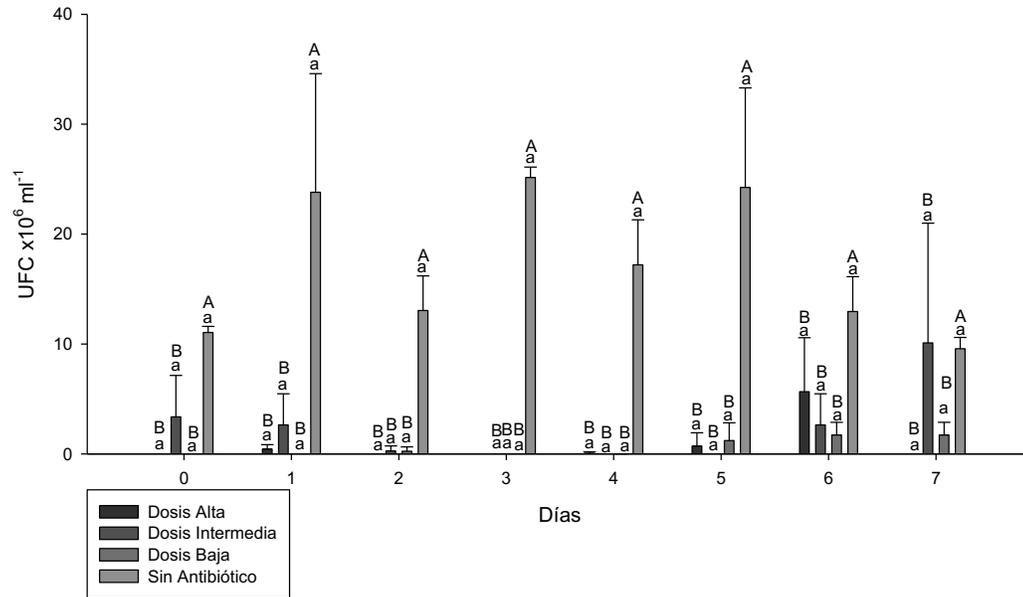
El conteo de unidades formadora de colonias (UFC) para evaluar la concentración de bacterias heterotróficas mostró una reducción total en el conteo de UFC  $\text{ml}^{-1}$  al día 3 (Figura 5). La concentración de

bacterias heterotróficas (BH) aumentó gradualmente en los días subsecuentes hasta el séptimo día, en donde el tratamiento, con dosis intermedia de antibiótico, superó el número de BH obtenidas con el tratamiento sin antibióticos. El tratamiento con dosis alta de antibiótico permaneció con bajos conteos de UFC ml<sup>-1</sup> hasta el séptimo día. El efecto de los antibióticos demostró ser de acción inmediata, ya que al día del inicio del ensayo (día 0) se registró una reducción en el conteo de UFC ml<sup>-1</sup> en comparación al tratamiento control sin antibióticos (Figura 5).

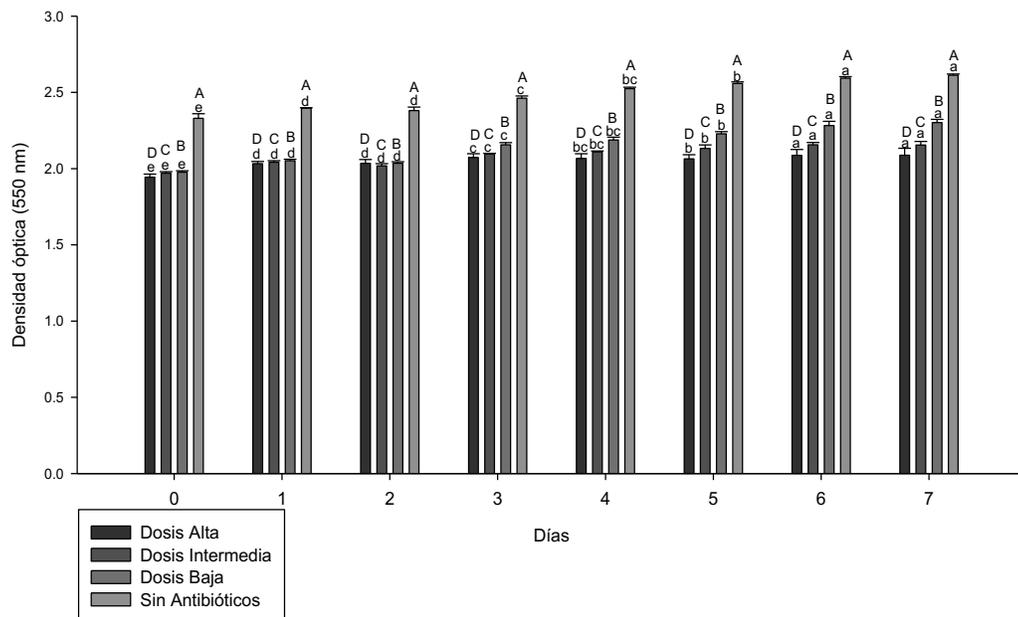
La densidad óptica (DO) muestra que cada tratamiento es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) y cada uno de los días evaluados es un grupo de datos estadísticamente diferente respecto al tiempo ( $P < 0.05$ ). El día inicial (día 0) fue el que presentó menor DO y el día con mayor valor de DO de todos los tratamientos fue el séptimo día, lo cual indica que a pesar de las diferentes dosis del coctel de antibióticos hubo crecimiento en la población de *Arthrospira maxima* (Figura 6).



**Figura 4.** Densidad de filamentos de *Arthrospira maxima* del primer coctel de antibióticos en dosis alta [neomicina (Neo): 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomicina (Est): 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina (Kan): 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [Neo: 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis baja [Neo 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha = 0.05$ ; Tukey HSD a; A>B. Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento.



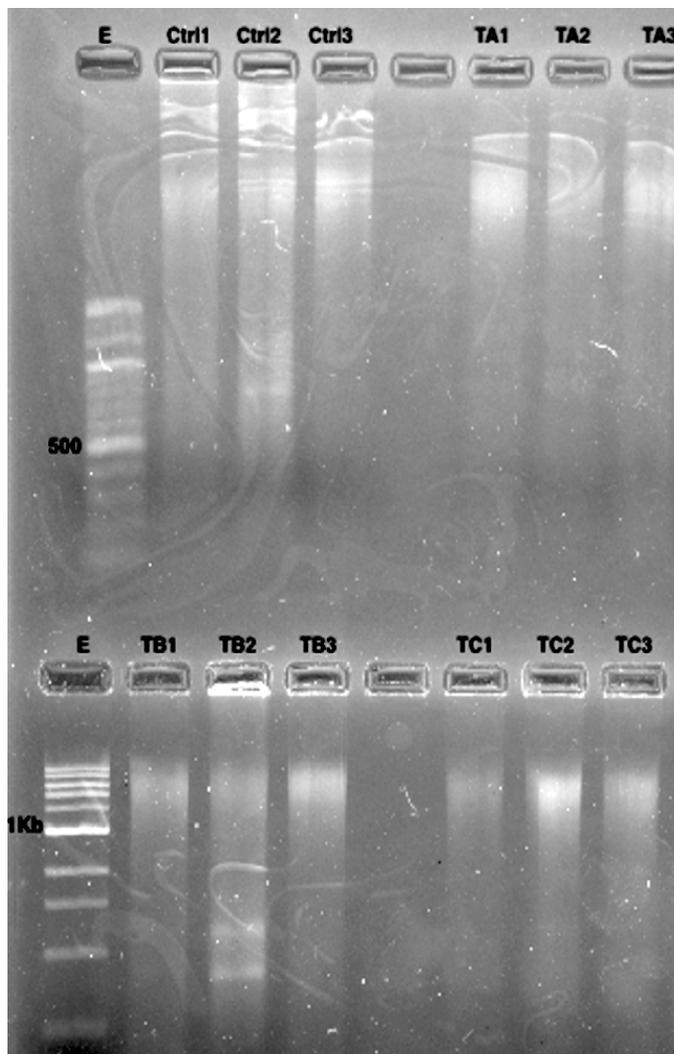
**Figura 5.** Densidad de bacterias heterotróficas de *Arthrospira maxima* del primer coctel de antibióticos en dosis alta [neomicina (Neo): 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomicina (Est): 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina (Kan): 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [Neo: 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis baja [Neo 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD a; A>B. Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento.



**Figura 6.** Densidad óptica de *Arthrospira maxima* del primer coctel de antibióticos en dosis alta [neomicina (Neo): 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomicina (Est): 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina (Kan): 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [Neo: 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis baja [Neo 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD a>b>c>d>e; A>B>C>D. Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento.

Se realizó la extracción de ARN de los cultivos de *Arthrospira maxima* del ensayo de axenización con el primer coctel de antibióticos y posteriormente se procedió a corroborar la integridad del ARN.

Se presentó desintegración del material genético (ADN, así como ARN), únicamente en la muestra TB2 se pueden discernir las bandas de las subunidades 23S y 16S (Figura 7).



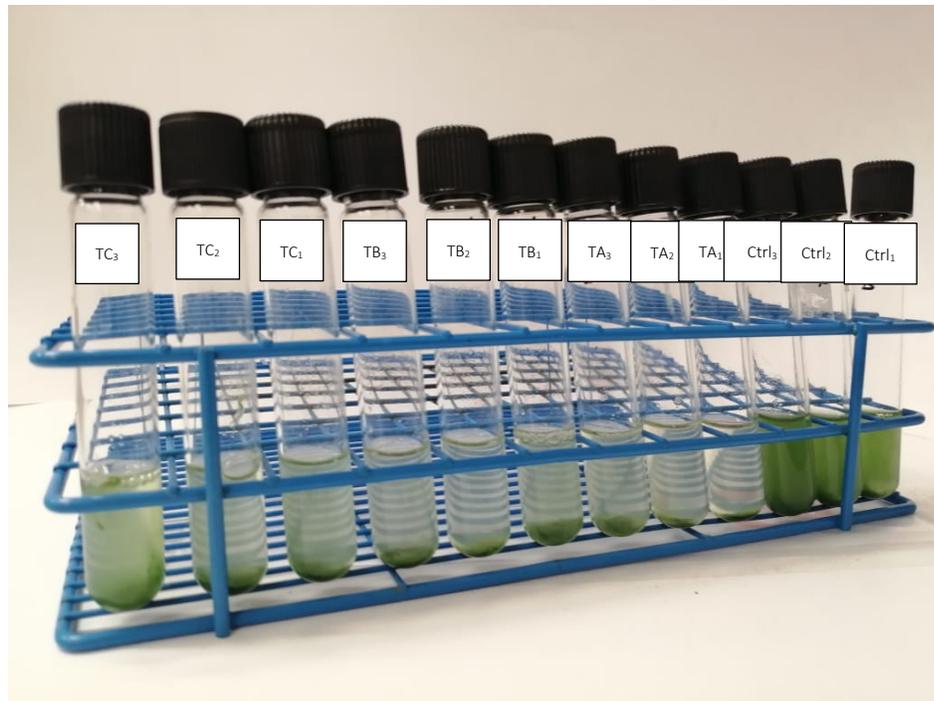
**Figura 7.** Evaluación de la integridad de las extracciones de ARN del primer ensayo de axenización de *Arthrospira maxima* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. E: Escalera (arriba: 100bp y abajo: 1Kb), Ctrl: tratamientos control (sin antibióticos), TA: tratamientos con dosis alta [neomicina (Neo): 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp): 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomicina (Est): 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina (Kan): 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], TB: tratamientos con dosis media [Neo: 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], TC: tratamientos con dosis baja [Neo 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Amp: 31.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Est: 6.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Kan: 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ].

Al terminar el ensayo de axenización, con el objetivo de comparar el daño de los tratamientos con antibióticos a los cultivos de *A. maxima*, se hizo una selección de muestras aleatoria de cada uno de los tratamientos para tomar las imágenes más representativas de cada tratamiento por medio del software ImagePro Plus versión 5.1 y un microscopio compuesto Olympus CX-31.

### 3.2.2 Segundo coctel de antibióticos

Para el tratamiento control se observó una densidad promedio de  $0.6 \times 10^6$  filamentos  $\text{ml}^{-1}$  en las tres diferentes réplicas, en el tratamiento control se pudo observar bajo el microscopio una gran presencia de bacterias en movimiento.

La dosis alta de antibióticos tuvo un efecto negativo sobre los filamentos de *Spirulina maxima*. Se observaron escisiones en los tricomas dando la apariencia de tener un cultivo rico en hormogonios, sin embargo, estos fragmentos se observaron decolorados y sin la forma redondeada típica de cada extremo de un hormogonio sano (anexo 1). Durante el ensayo, no se observaron bacterias heterotróficas en la muestra.



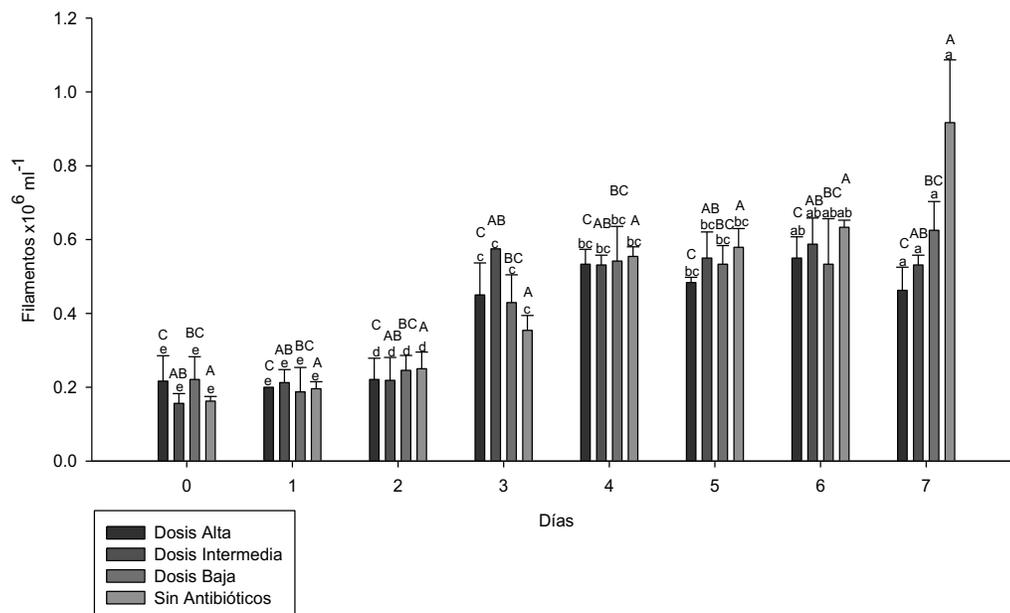
**Figura 8.** Cultivos de *Arthrospira maxima* con el segundo coctel de antibióticos en TA: dosis alta [ampicilina, ceftioxitina y penicilina G (ACP) cada uno a  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ], TB: dosis media [ $112.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y TC: dosis baja [ $75 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y Ctrl: tratamiento control (sin antibiótico). Los números al lado de las claves utilizadas para los tratamientos representan el número de la repetición de cada tratamiento.

Al inocular una dosis intermedia del coctel 1 de antibióticos al cultivo, la densidad de filamentos se vio en densidad moderada ( $0.58 \times 10^6$  filamentos  $\text{ml}^{-1}$ ), los tricomas presentan longitudes mayores comparados con el tratamiento de dosis alta y en escasas ocasiones se observan tricomas con morfotipo de espira. No se observaron bacterias heterotróficas en la muestra.

En el tratamiento con dosis baja de antibióticos se observaron tricomas de buen tamaño, cantidad y color. Sin embargo, en el microscopio se observaron bacterias heterotróficas en las 3 repeticiones de este tratamiento.

De manera general, los tres tratamientos evaluados con diferentes dosis del coctel de antibióticos tuvieron un efecto directo en la apariencia del cultivo (Figura 8). De los tres tratamientos evaluados se observó una clarificación del cultivo lo cual tiene una relación directa con la medición de la densidad óptica a través del tiempo del ensayo (Figura 10).

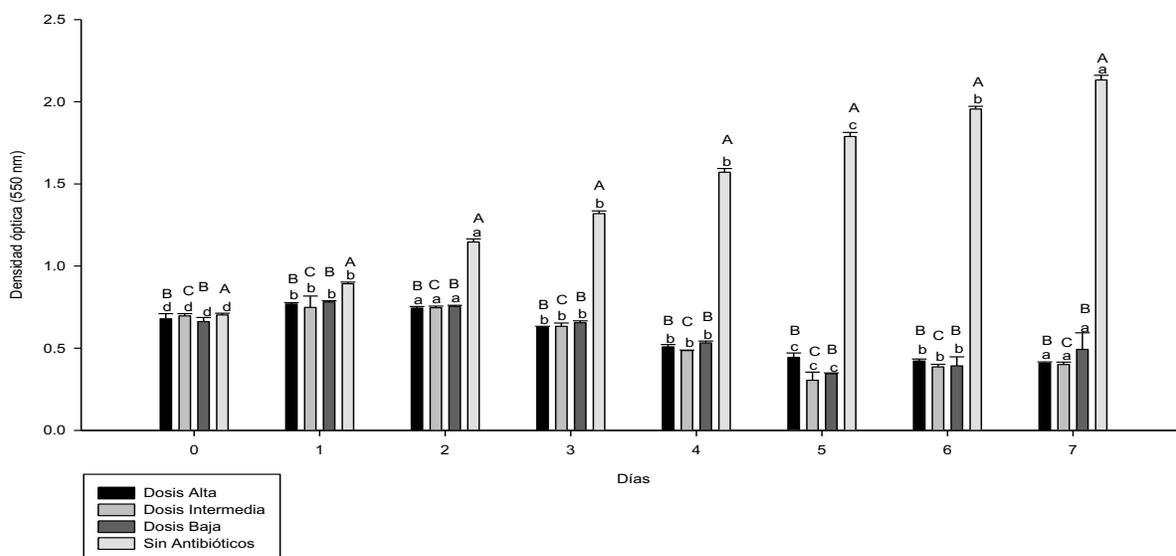
La densidad de filamentos de *Arthrospira maxima* pareció aumentar con el paso del tiempo independientemente de la dosis de antibióticos previamente inoculada en el cultivo (Figura 9). Sin embargo, en este trabajo se toma con precaución esta medición debido a que la medición del crecimiento de los cultivos mediante la densidad óptica presenta una tendencia a la baja (Figura 10).



**Figura 9.** Densidad de filamentos de *Arthrospira maxima* del segundo coctel de antibióticos en dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [ $112.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y dosis baja [ $75 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD  $a>b>c>d>e$ ;  $A>B>C$ . Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento.

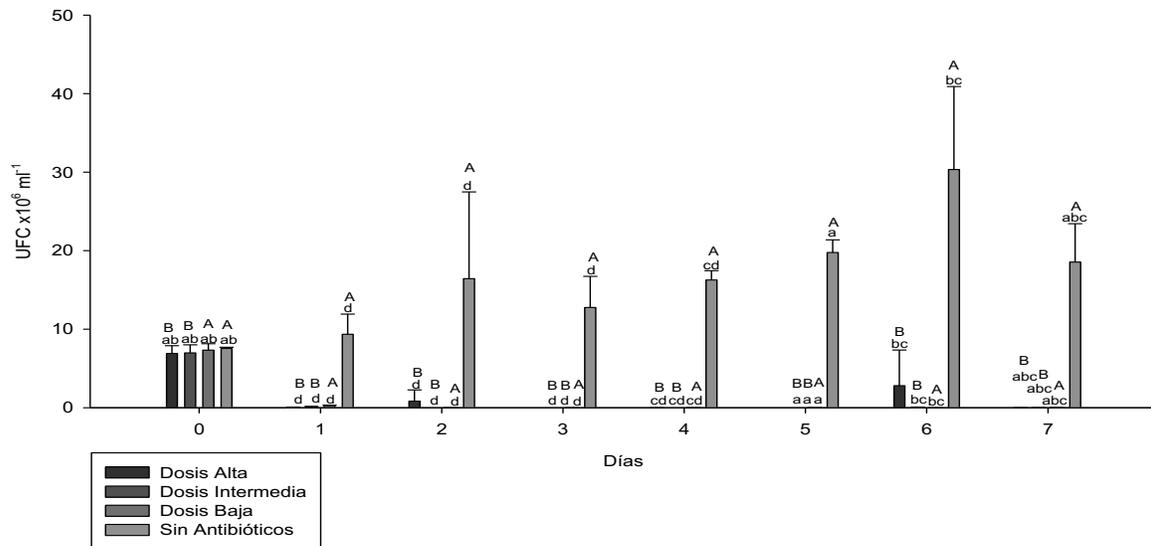
La evaluación de la densidad óptica en el segundo ensayo de axenización mostró que la densidad de los cultivos se vio afectada negativamente por la adición del coctel de antibióticos con las tres dosis evaluadas (Figura 10).

Todos los tratamientos de axenización iniciaron al día 0 con una densidad óptica de 0.68 en promedio y al final del experimento los tratamientos experimentales terminaron con una densidad óptica de 0.43 en promedio, lo cual indica que, en lugar de haber crecimiento en la DO con el paso del tiempo, hubo una reducción en comparación con el tratamiento control sin antibióticos. Sin embargo, algunas células de *Arthrospira maxima* pudieron crecer hasta el día 7 (Figura 10).



**Figura 10.** Densidad óptica *Arthrospira maxima* del segundo coctel de antibióticos en dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [ $112.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y dosis baja [ $75 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD  $a>b>c>d$ ;  $A>B>C$ . Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento.

El conteo de las unidades formadoras de colonias mostró en todos los tratamientos con antibióticos una reducción de los valores a partir del día 1. El tratamiento con dosis alta del coctel de antibióticos presentó un ligero incremento en los días 2 y 6 de cultivo. Con todos los tratamientos de antibióticos utilizados, la carga bacteriana se mantuvo en menos de  $10 \times 10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  y en algunos casos la carga se mantuvo indetectable (Figura 11).



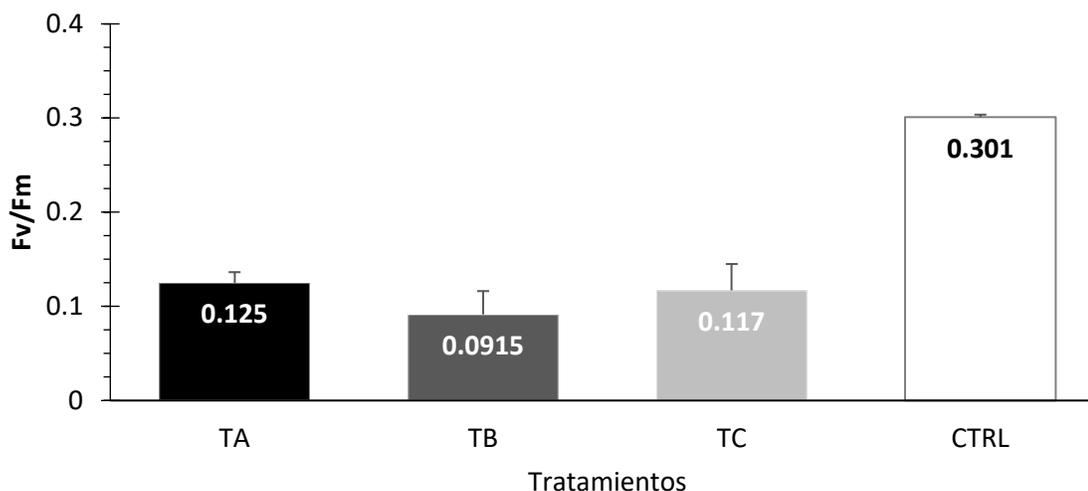
**Figura 11.** Densidad de bacterias heterotróficas *Arthrospira maxima* del segundo coctel de antibióticos en dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ], dosis media [ $112.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y dosis baja [ $75 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y tratamiento control (sin antibiótico). ANOVA de dos vías,  $\alpha=0.05$ ; Tukey HSD  $a>b>c>d$ ;  $A>B$ . Las diferentes letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo. Las diferentes letras en mayúsculas indican las diferencias significativas en el factor tratamiento.

**Tabla 3.** Evaluación de la calidad de la extracción de ARN de los cultivos axénicos de *Arthrospira maxima* mediante espectrofotometría en Nanodrop 2000®. Ctrl: tratamiento sin antibióticos, A1-3: tratamientos con dosis alta de antibióticos, B1-3 tratamiento con dosis intermedia de antibióticos, C1-3 tratamiento con dosis baja de antibióticos. ARN: ácido ribonucleico, 260/280: relación que indica contaminación por reactivos y 260/230: relación que indica contaminación por proteínas.

Tratamiento	ARN ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ )	260/280	260/230
Ctrl 1	205.1	2.04	1.08
Ctrl 2	297.6	2.06	1.59
Ctrl 3	037.9	2.03	0.48
A1	134.8	1.85	1.04
A2	093.1	2.00	1.03
A3	103.7	2.04	1.15
B1	108.6	1.99	0.99
B2	386.4	2.05	2.00
B3	088.9	1.91	0.89
C1	081.2	2.03	1.08
C2	100.1	2.02	0.54
C3	060.2	2.04	0.35

El segundo coctel de antibióticos evaluado mostró ser efectivo para reducir la carga de bacterias heterotróficas. Sin embargo, la DO de los cultivos de *Arthrospira maxima* decreció, la integridad de los filamentos se vio comprometida y la cantidad del ARN de los cultivos se observó reducida y de baja calidad (Tabla 3).

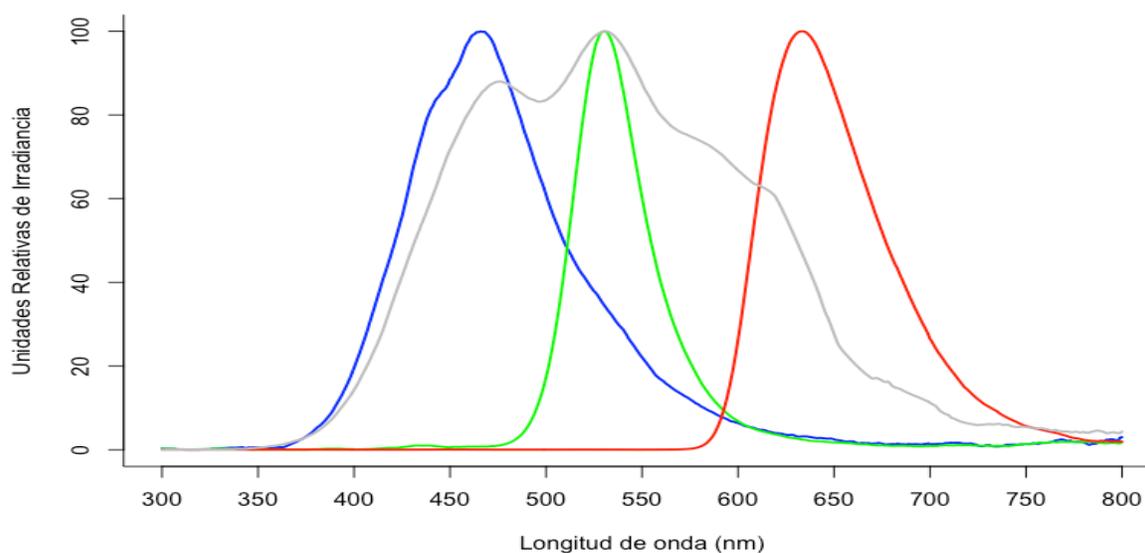
Debido a que se pudo cuantificar una reducción en la cantidad de ARN con respecto a los cultivos de *Arthrospira maxima* sin antibióticos y, aunado a que la máxima producción fotoquímica del PSII (Fv/Fm) se vio afectada por efecto de las tres concentraciones de antibióticos con respecto al tratamiento control sin antibióticos (Figura 12), se continuó con la evaluación de los cambios fisiológicos y los cambios en la composición bioquímica de los cultivos de *Arthrospira maxima* por efecto de la composición espectral de la luz sin realizar la axenización de los cultivos.



**Figura 12.** Máxima producción fotoquímica del PSII (Fv/Fm) de los cultivos de *Arthrospira maxima* con el segundo coctel de antibióticos TA: dosis alta [ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ], TB: dosis media [ $112.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP], TC: dosis baja [ $75 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ACP] y Ctrl: tratamiento control (sin antibiótico).

### 3.3 Efecto de la composición espectral de la luz

Se mantuvieron los cultivos de *Arthrospira maxima* a diferente composición espectral de luz (Figura 13).



**Figura 13.** Composición espectral de las lámparas fluorescentes usadas para el crecimiento de los cultivos de *Arthorspira maxima*.

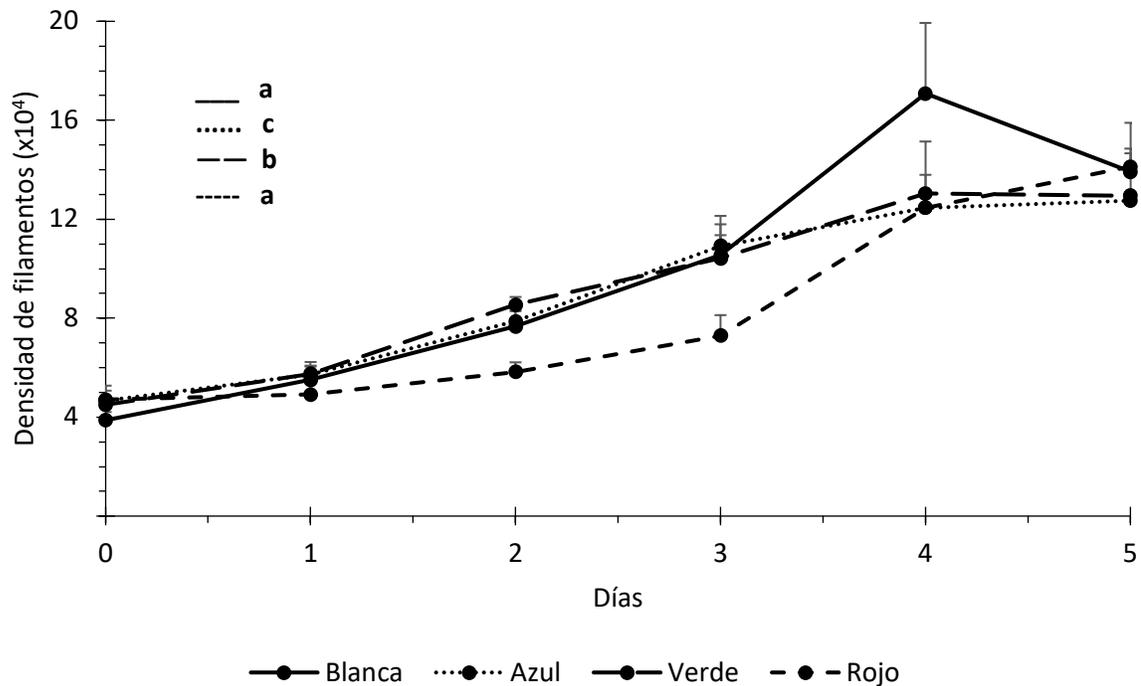
Los parámetros espectrales de las lámparas fluorescentes muestran la posición del máximo de irradiancia, el rango espectral, el ancho espectral medio y la tasa de cambio entre la máxima irradiancia del espectro original respecto al espectro suavizado para las lámparas azul, verde, roja y blanca (Tabla 4).

**Tabla 4.** Parámetros espectrales principales de las lámparas fluorescentes de cada tratamiento. FWHM: ancho espectral medio por sus siglas en inglés (Full Width Half Maximum: FWHM),  $\Delta_{rel}$ : tasa de cambio entre la máxima irradiancia del espectro original con respecto al espectro suavizado.

Lámpara	Posición del máximo de irradiancia (nm)	Rango espectral (nm)	FWHM (nm)	$\Delta_{rel}$ (%)
Azul	460.92	403 – 540	137	9.35
Verde	529.35	510 – 556	46	6.52
Roja	639.00	613 – 679	66	6.91
Blanca	531.47	440 – 627	183	14.01

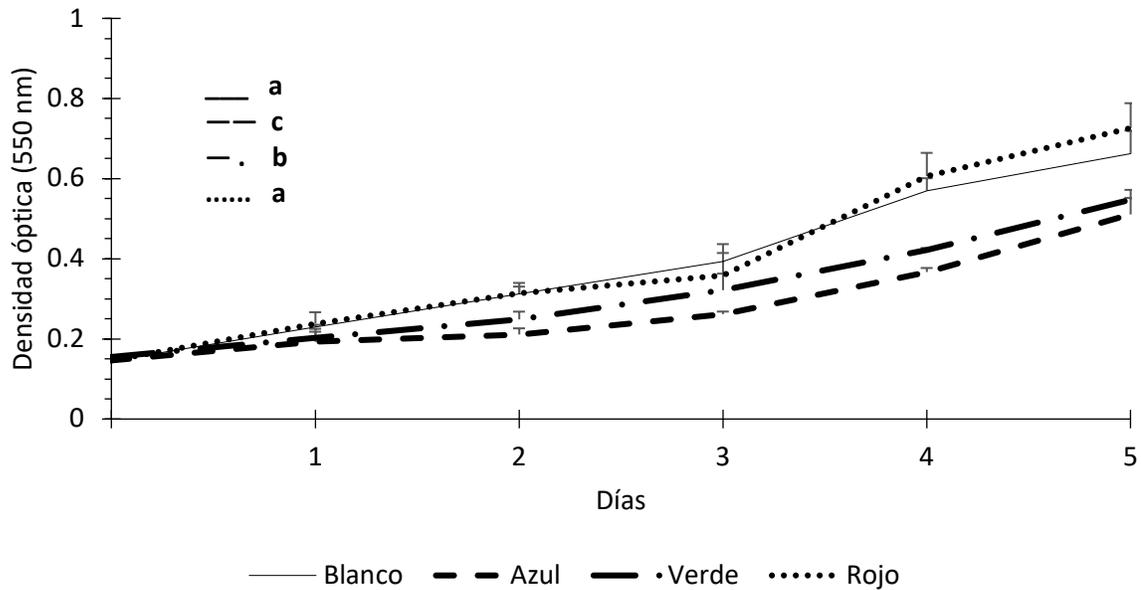
### 3.3.1 Crecimiento y parámetros poblacionales

Las curvas de crecimiento de *Arthrospira maxima* presentaron diferencias significativas (ANCOVA,  $P < 0.05$ ) por efecto de la composición espectral (Figura 14 y 15). Los mayores valores de la densidad de filamentos se encontraron en los cultivos expuestos a luz blanca y luz roja, mientras que los menores valores se evaluaron con luz azul al día 5 (Figura 14).



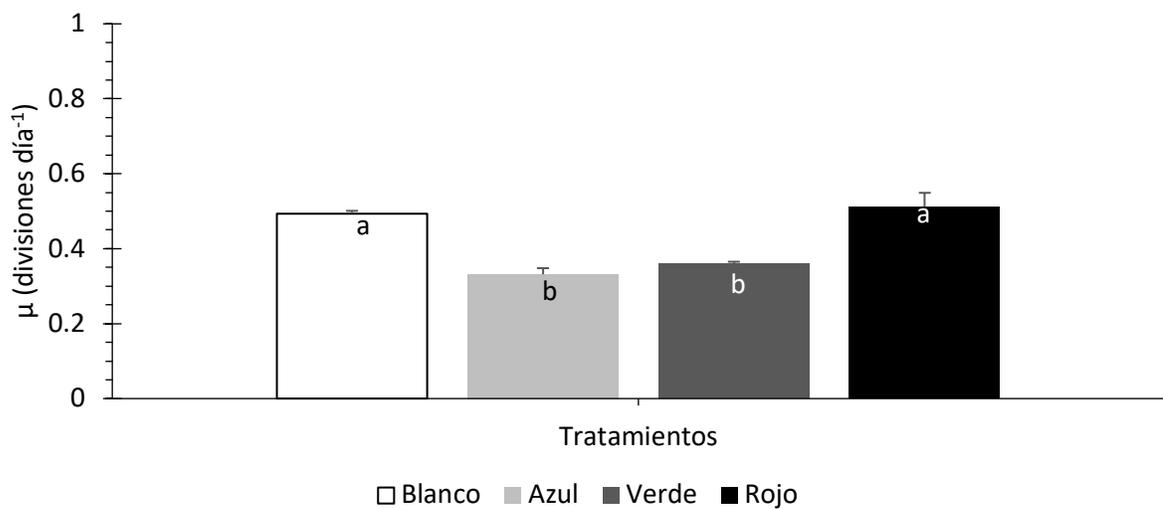
**Figura 14.** Curva de crecimiento de *Arthrospira maxima* mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Letras distintas indica diferencias significativas entre tratamientos por análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba *a posteriori* Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ :  $a > b > c$ .

Las curvas de crecimiento con la absorbancia de *Arthrospira maxima* presentaron diferencias significativas (ANCOVA,  $P < 0.05$ ) por efecto de la composición espectral (Figura 15). Los mayores valores de la densidad óptica se encontraron en los cultivos expuestos a luz blanca y luz roja, mientras que los menores valores se midieron con luz azul.



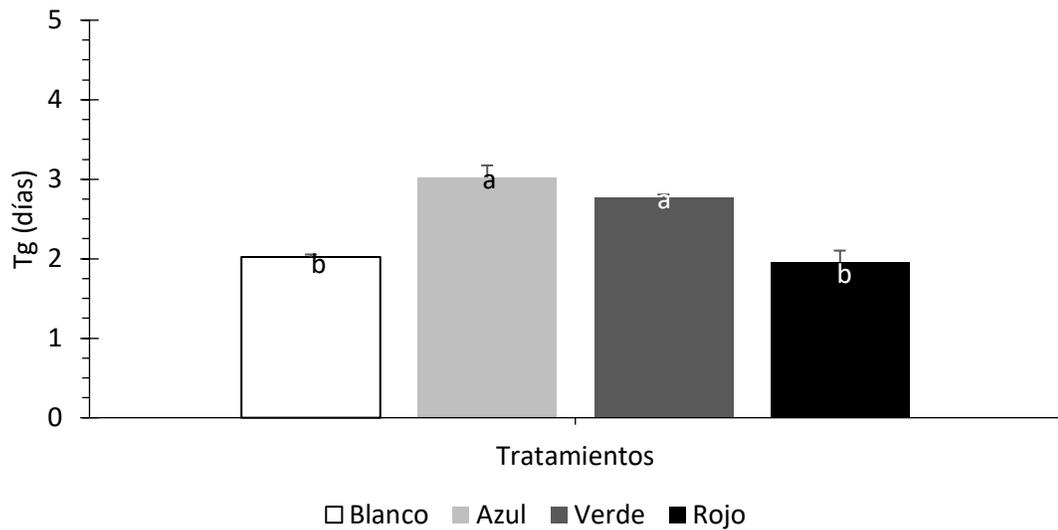
**Figura 15.** Absorbancia de *Arthrospira maxima* en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos por análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba *a posteriori* Tukey HSD  $\alpha=0.05$ :  $a>b>c$ .

La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) calculada a partir de la densidad óptica de los cultivos de *Arthrospira maxima* presentó diferencias significativas ( $P<0.05$ ) por efecto de la composición espectral y los mayores valores se tuvieron con la luz blanca y roja (Figura 16).



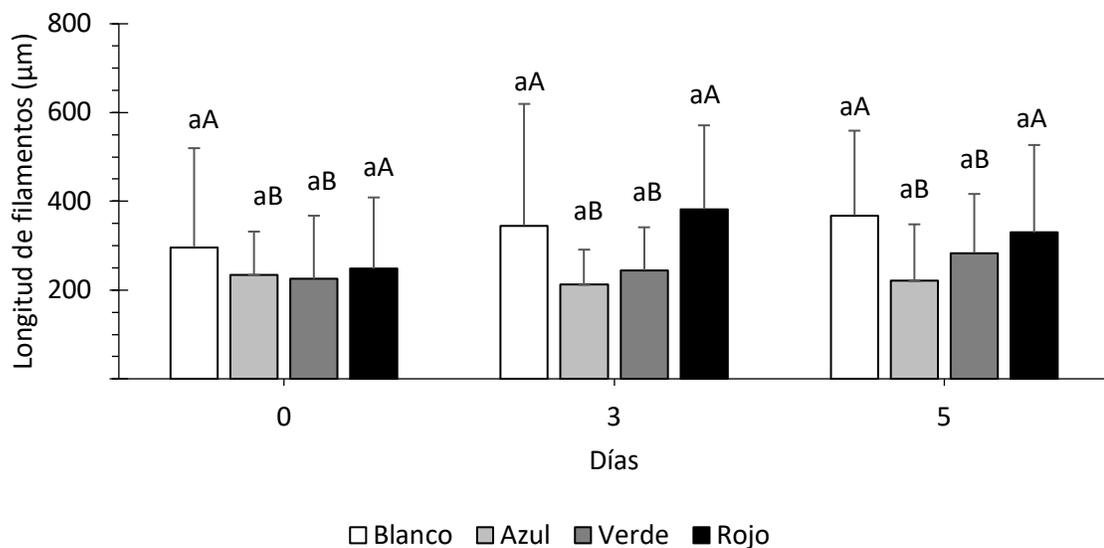
**Figura 16.** Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) calculada con los valores de densidad óptica de *Arthrospira maxima* mantenidos en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha=0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. Las letras indican las diferencias significativas entre tratamientos  $a>b$ .

El tiempo de generación (Tg) de *Arthrospira maxima* presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por efecto de la composición espectral de la luz y los valores mayores se obtuvieron con luz azul y verde (Figura 17).



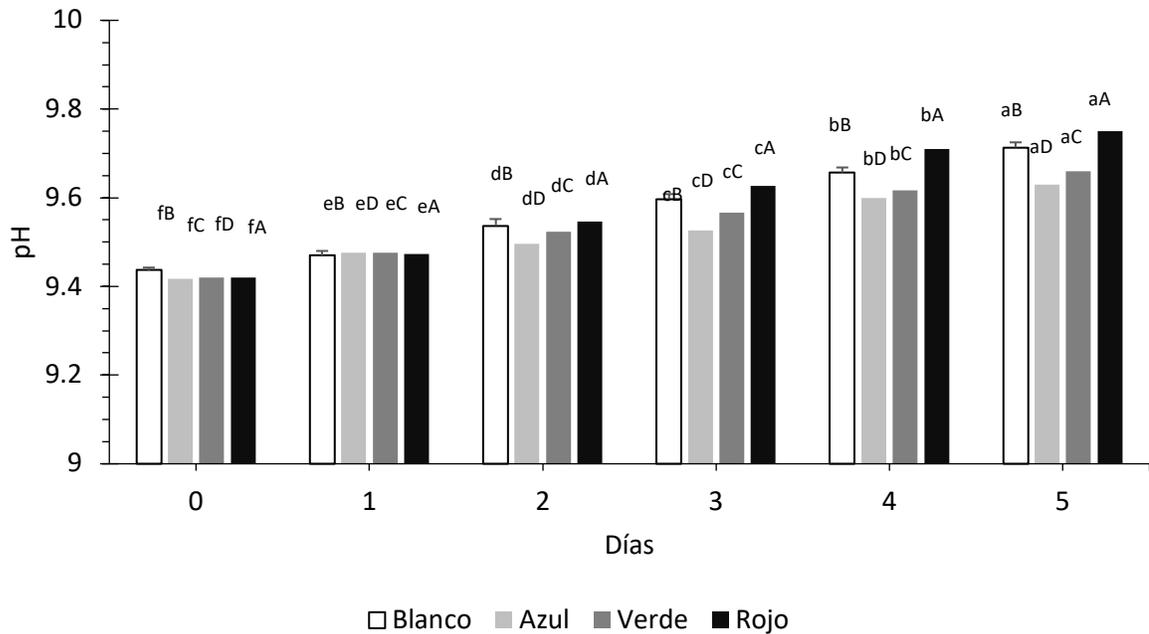
**Figura 17.** Tiempo de generación (Tg) calculada con los valores de densidad óptica de *Arthrospira maxima* mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha = 0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. Las letras indican las diferencias significativas entre tratamientos  $a > b$ .

La longitud de filamentos no presentó diferencias significativas en el tiempo ( $P < 0.05$ ) pero si presentó diferencias significativas por efecto de la composición espectral, la mayor longitud de filamentos se obtuvo con la luz blanca y roja (Figura 18).



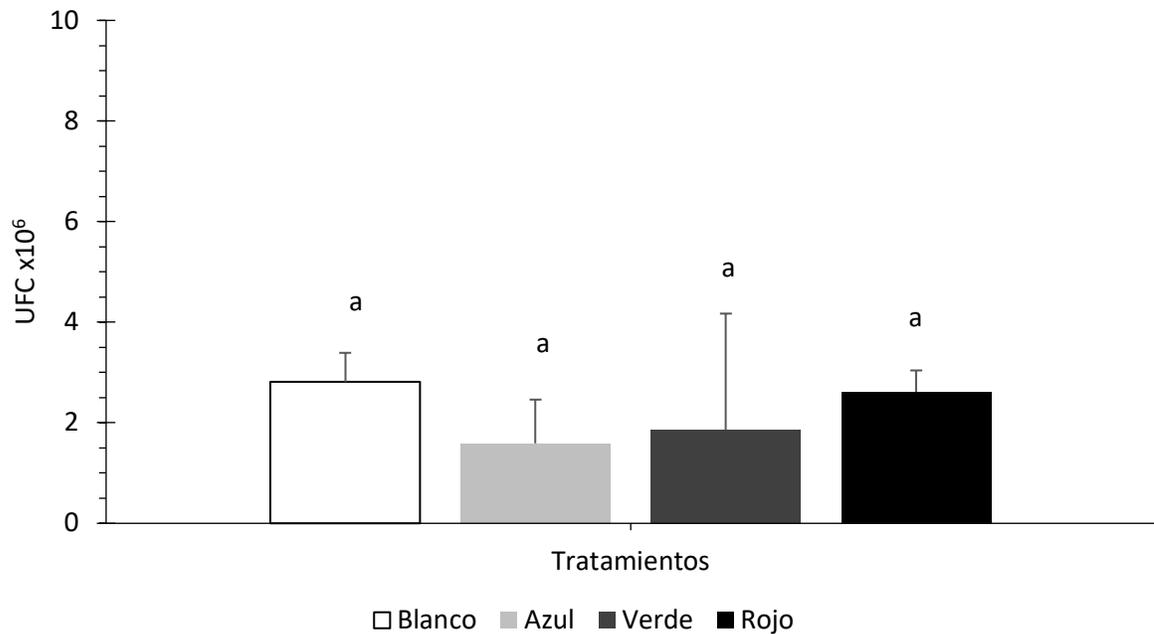
**Figura 18.** Longitud de los filamentos de *Arthrospira maxima* mantenidos en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA)  $\alpha = 0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. Letras iguales en minúscula indican que no hay diferencias significativas en el tiempo: a. Las letras mayúsculas indica diferencias significativas de los tratamientos:  $A > B$ .

El pH tuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los cultivos de *Arthrospira maxima* en el tiempo y por efecto de los diferentes tratamientos (Figura 19). El último día fue evaluado con los mayores valores de pH, sin embargo, el tratamiento con luz roja presentó el mayor valor de pH y la luz azul los menores valores.



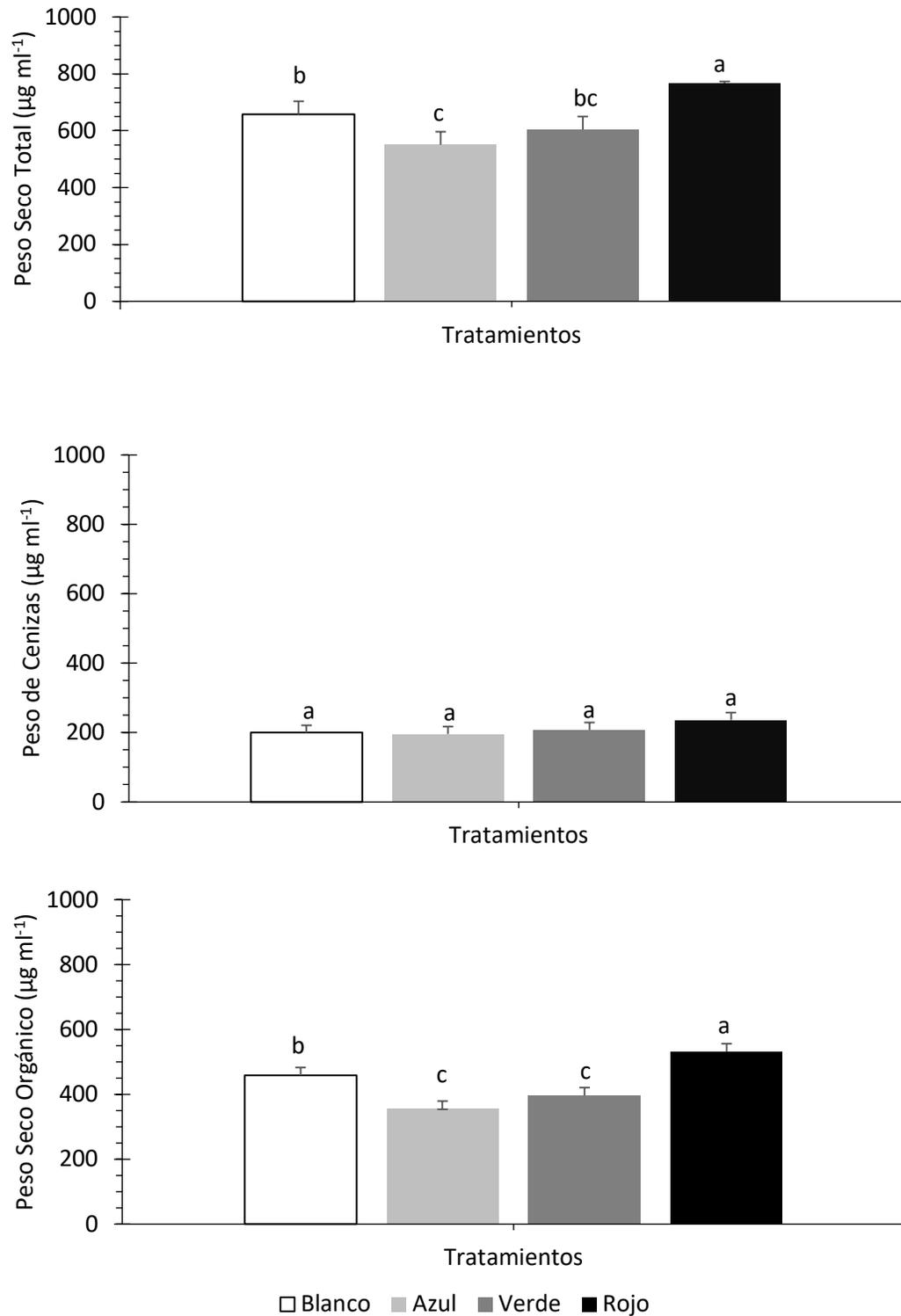
**Figura 19.** Valores de pH de los cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento de *Arthrospira maxima*. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA)  $\alpha = 0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo:  $a > b > c > d > e > f$ . Las letras mayúsculas indica diferencias significativas de los tratamientos:  $A > B > C > D$ .

La densidad de bacterias heterotróficas no presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por efecto de la composición espectral de la luz en los cultivos de *Arthrospira maxima* (Figura 20).



**Figura 20.** Concentración de bacterias heterotróficas en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Arthrospira maxima* mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha=0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. La letra a indica que no hubo diferencias significativas en el tiempo.

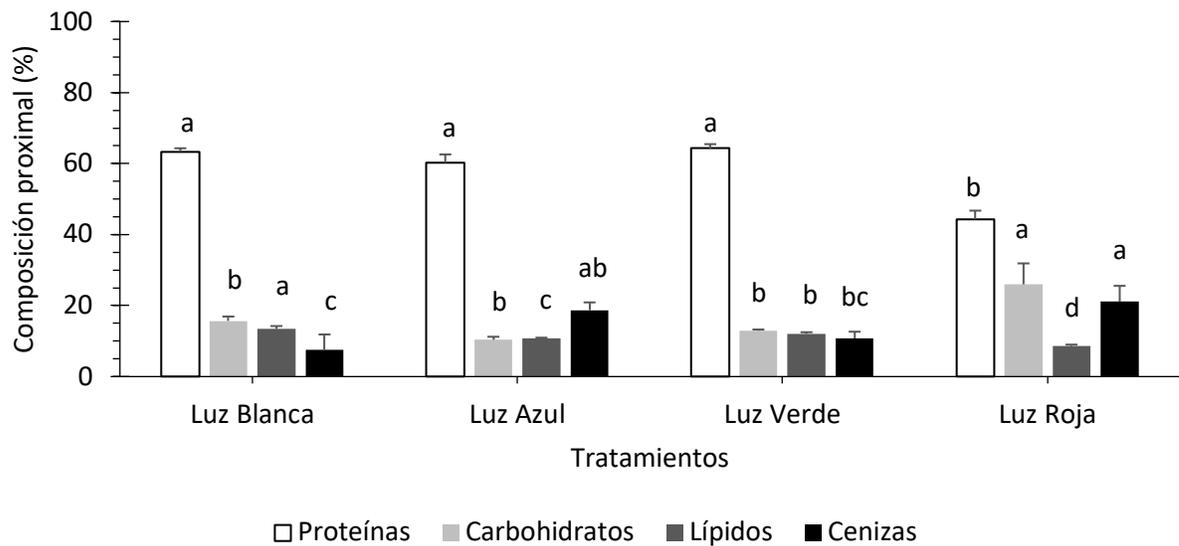
El peso seco total de los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenida con diferente composición espectral de la luz presentó diferencias significativas ( $P<0.05$ ) (Figura 21a). Los valores mayores de peso seco total se obtuvieron en los cultivos con luz roja y los menores valores en luz azul. El peso de las cenizas no presentó diferencias significativas ( $P>0.05$ ) por efecto de la composición espectral de la luz (Figura 21b). Los valores mayores del peso seco orgánico se obtuvieron en los cultivos con luz roja, mientras que los menores valores fueron obtenidos en los cultivos con luz y verde (Figura 21).



**Figura 21.** Peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico de *Arthrospira maxima* mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha=0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo:  $a>b>c$ .

### 3.3.2 Composición proximal

La composición proximal de los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenidos con diferente composición espectral de la luz presentaron diferencias (Figura 22). El significativamente mayor contenido de proteínas fue obtenido en los cultivos con luz blanca, azul y verde ( $P < 0.05$ ), el significativamente mayor contenido de carbohidratos se observó en la luz roja ( $P < 0.05$ ), el significativamente mayor contenido de lípidos fue obtenido con la luz azul ( $P < 0.05$ ) y los menores valores con luz roja. Se obtuvo el significativamente mayor contenido de cenizas en la luz roja y el menor valor en la luz blanca y verde ( $P < 0.05$ ) (Figura 22).



**Figura 22.** Composición proximal de los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha = 0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD para cada nutriente y cenizas. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas por tratamiento:  $a > b > c > d$ .

### 3.3.3 Fotosíntesis y pigmentos

Los cultivos de *Arthrospira maxima* expuestos a la luz roja presentaron una eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) significativamente mayor, mientras que con la luz azul fue la menor ( $P < 0.05$ ) (Tabla 5; Figura 23).

La tasa de transporte de electrones máxima (ETR<sub>max</sub>) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenidos con luz blanca (Tabla 5; Figura 23).

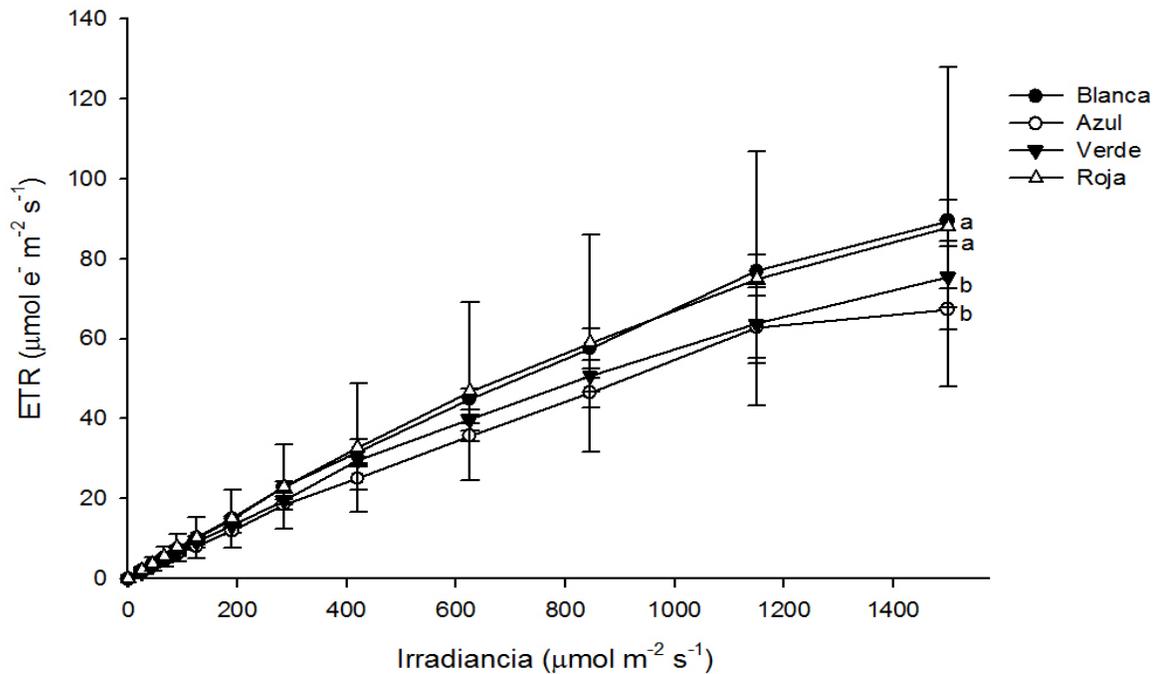
Los cultivos de *Arthrospira maxima* cultivados con luz blanca presentaron una irradiancia de saturación ( $E_k$ ) significativamente mayor ( $P<0.05$ ) (Tabla 5).

El rendimiento cuántico fotoquímico ( $F_v/F_m$ ) fue significativamente mayor ( $P<0.05$ ) en los cultivos mantenidos con luz blanca (Tabla 5).

**Tabla 5.** Parámetros fotosintéticos de cultivos de *Arthrospira maxima* mantenidos con diferente composición espectral de la luz: Eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ), máxima tasa de transporte de electrones (ETRmax en  $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), irradiancia de saturación ( $E_k$  en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), máximo rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ). Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha=0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. Las letras indican las diferencias significativas entre tratamientos  $a>b>c$ .

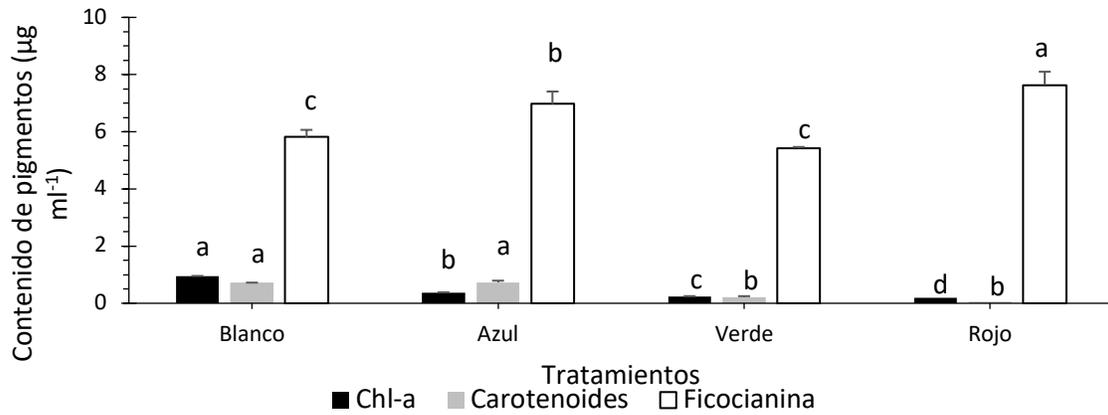
Tratamiento	$\alpha$	ETRmax	$E_k$	$F_v/F_m$
Luz blanca	0.082 $\pm$ 0.007 ab	318.4 $\pm$ 8.93 a	3794.1 $\pm$ 389.27 a	0.27 $\pm$ 0.003 b
Luz azul	0.064 $\pm$ 0.004 b	86.7 $\pm$ 0.86 c	1169.3 $\pm$ 80.03 b	0.33 $\pm$ 0.011 a
Luz verde	0.075 $\pm$ 0.003 ab	116.8 $\pm$ 28.43 b	1534.2 $\pm$ 299.70 b	0.26 $\pm$ 0.011 b
Luz roja	0.083 $\pm$ 0.010 a	118.4 $\pm$ 1.98 b	1392.9 $\pm$ 47.90 b	0.28 $\pm$ 0.043 a

Las curvas rápidas de luz (CRL) presentaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenidos con diferentes composición espectral de la luz. Los tratamientos de luz blanca y el tratamiento de luz roja tuvieron los mayores valores de la tasa de transporte de electrones (ETR). Las CRL demostraron que *Arthrospira maxima* no presentó fotoinhibición del PSII en la irradiancia evaluada ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



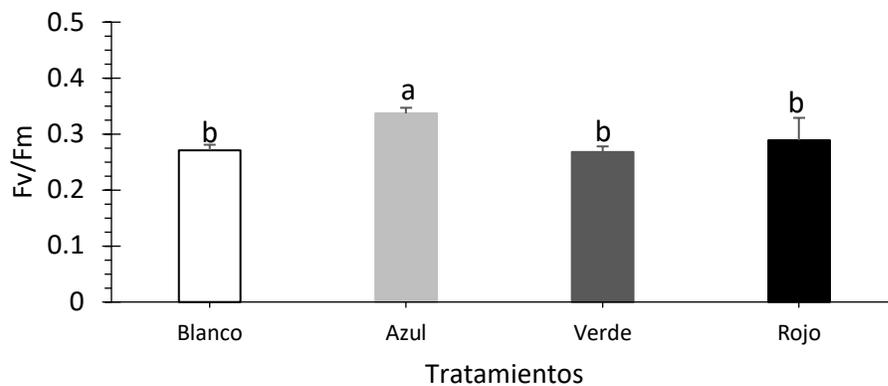
**Figura 23.** Curvas rápidas de luz de la tasa de transporte de electrones (ETR) de los cultivos de *Arthrospira maxima* expuestos a luz blanca (●), azul (○), verde (▼) y roja (△). Letras distintas indica diferencias significativas entre tratamientos por análisis de covarianza (ANCOVA) y prueba *a posteriori* Tukey HSD,  $\alpha=0.05$ :  $a>b$ .

El contenido de pigmentos fotosintéticos de *Arthrospira maxima* en los cultivos mantenidos bajo diferentes condiciones de luz presentaron diferencias significativas por efecto del tipo de luz ( $P<0.05$ ). El mayor contenido de clorofila a (Cl-a) fue con luz blanca y el menor con la luz roja. La luz blanca y roja produjeron la mayor cantidad de carotenoides. El mayor contenido de ficocianina fue con la luz roja, sin embargo, el menor contenido de ficocianina fue en la luz blanca y verde (Figura 24).



**Figura 24.** Pigmentos fotosintéticos de los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha=0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo:  $a>b>c>d$ .

La máxima producción fotoquímica como indicador del estado fisiológico de *Arthrospira maxima* cultivada con diferente composición espectral de la luz fue diferente entre los tratamientos evaluados ( $P<0.05$ ) (Figura 25).



**Figura 25.** Máxima producción fotoquímica ( $F_v/F_m$ ) de *Arthrospira maxima* mantenida en cultivos con distinta composición espectral de la luz durante la fase exponencial de crecimiento. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha=0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas en el tiempo:  $a>b$ .

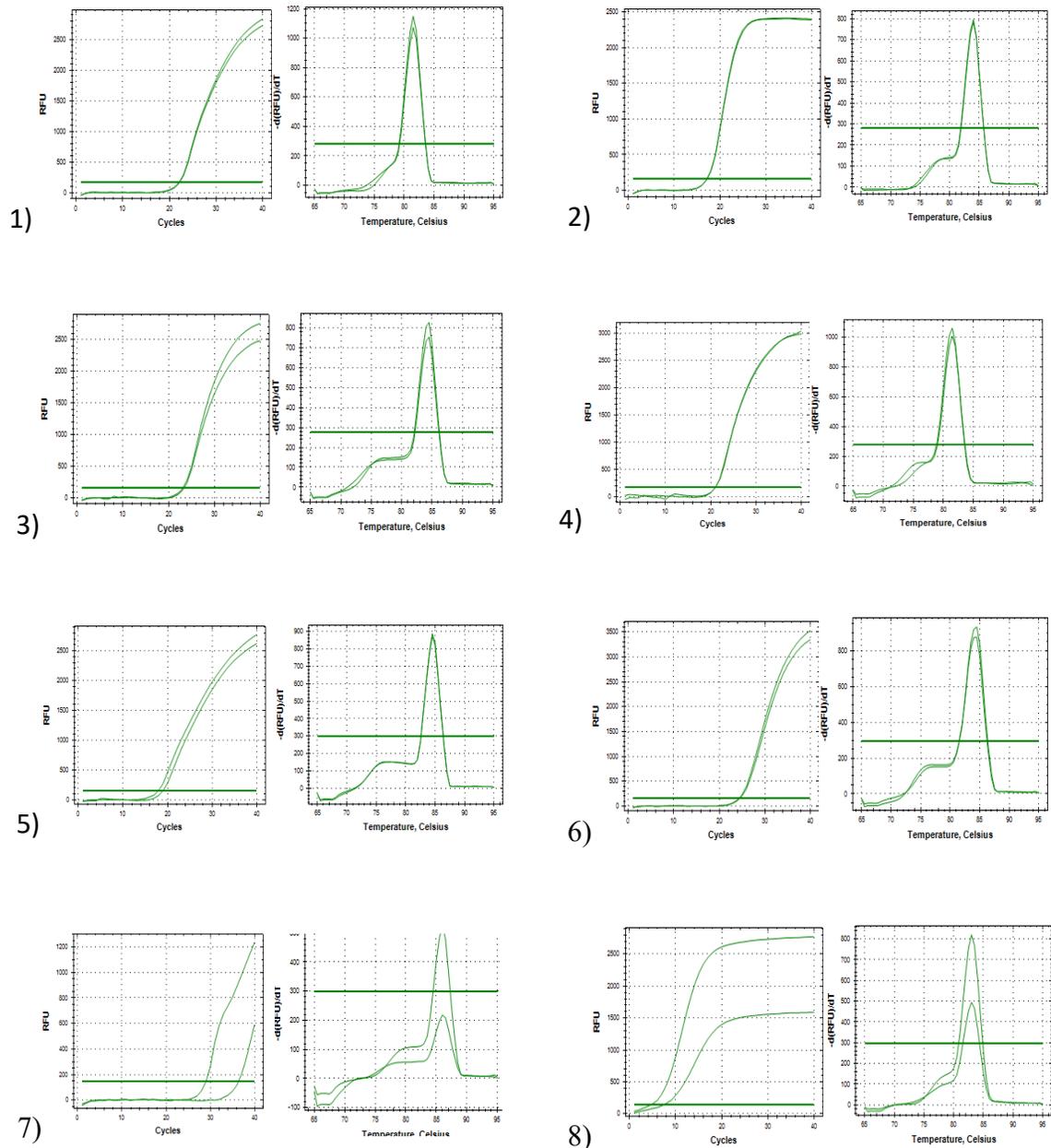
### 3.3.4 Estandarización de la qPCR

Al realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real de los siete genes experimentales se obtuvo una amplificación entre los 17 y 24 ciclos, excepto por el gen *fabZ* el cual presentó amplificación entre los 29 y 36 ciclos (Tabla 6). El gen de referencia (16S), en contraste con la mayoría de los genes experimentales, presentó un ciclo de cuantificación considerablemente menor al presentar un valor de Cq de entre 4 y 7 ciclos.

**Tabla 6.** Valores de Cq (ciclo de cuantificación) de los ocho genes evaluados en dilución 1:5 y dilución 1:10. Por cada gen se agregó un control negativo sin templado (NTC) el cual no presenta amplificación (N/A).

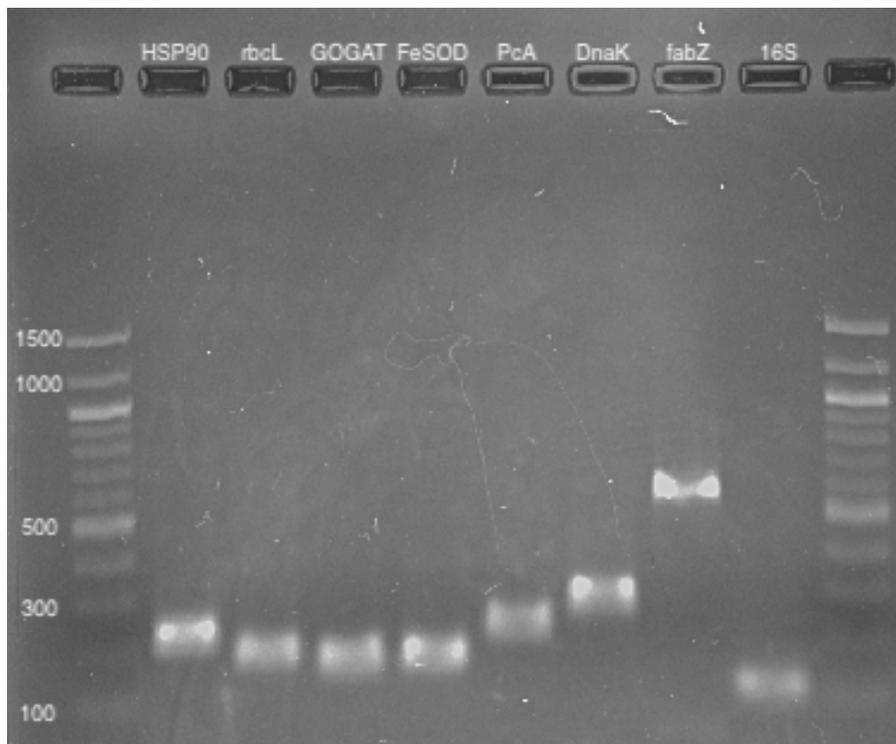
Gen	Tipo de muestra	Dilución	Cq	Gen	Tipo de muestra	Dilución	Cq
<i>HSP90</i>	AMC1	1:5	39.22	<i>PcA</i>	AMC1	1:5	20.83
	AMC1	1:5	20.89		AMC1	1:5	17.04
	AMC2	1:10	22.07		AMC2	1:10	18.90
	AMC2	1:10	22.16		AMC2	1:10	17.85
	NTC		38.26		NTC		N/A
<i>rbcL</i>	AMC1	1:5	16.18	<i>DnaK</i>	AMC1	1:5	25.06
	AMC1	1:5	16.41		AMC1	1:5	24.52
	AMC2	1:10	17.17		AMC2	1:10	24.41
	AMC2	1:10	17.20		AMC2	1:10	24.21
	NTC		N/A		NTC		N/A
<i>GOGAT</i>	AMC1	1:5	22.36	<i>fabZ</i>	AMC1	1:5	N/A
	AMC1	1:5	22.22		AMC1	1:5	39.36
	AMC2	1:10	23.16		AMC2	1:10	36.39
	AMC2	1:10	23.39		AMC2	1:10	29.03
	NTC		N/A		NTC		N/A
<i>FeSOD</i>	AMC1	1:5	32.36	<i>16S</i>	AMC1	1:5	7.24
	AMC1	1:5	19.93		AMC1	1:5	5.61
	AMC2	1:10	20.98		AMC2	1:10	7.60
	AMC2	1:10	21.01		AMC2	1:10	4.82
	NTC		N/A		NTC		N/A

Para todos los genes evaluados se presentó una curva de disociación con el punto máximo ubicado a una sola temperatura lo que quiere decir que el producto amplificado en esa reacción es altamente específico, por lo que se demostró que no hubo otros fragmentos indeseados o inespecíficos amplificando en la misma reacción. Esto es relevante porque denota la alta especificidad de la técnica de RT- qPCR (Tabla7).



**Figura 26.** Curvas de amplificación y curvas de disociación por duplicado de los genes seleccionados de *Arthrospira maxima* 1) Proteína chaperona de choque térmico a 90 °C *HSP90*, 2) RuBisCO subunidad grande *rbcl*, 3) Glutamato sintasa *GOGAT*, 4) Hierro superóxido dismutasa *FeSOD*, 5) Ficocianina subunidad alpha *Pca*, 6) Proteína chaperona *DnaK*, 7) Enzima de biosíntesis de ácidos grasos *fabZ*, 8) Gen de referencia *16S* ARNr.

Después de la amplificación por medio de qPCR, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos con el objetivo de conocer el tamaño de las secuencias amplificadas (Figura 26). Se encontró que los genes *HSP90*, *rbcL*, *GOGAT*, *FeSOD*, *PcA*, el gen de referencia (*16S*) e inclusive el gen *DnaK*, se encontraron dentro del tamaño aceptable para los requerimientos de la técnica qPCR. Sin embargo, se encontró que el gen *fabZ* presentó un tamaño aproximado de 599 pb. Por lo tanto, es posible amplificar el gen mediante qPCR, pero no es posible llevar una correcta cuantificación del producto de PCR.



**Figura 27.** Verificación de la longitud en pares de bases de los amplicones de la estandarización. Gel de agarosa 1.5X. Gen de la proteína de choque térmico (*HSP90*), gen de la proteína RUBISCO (*rbcL*), gen de la proteína glutamato sintasa (*GOGAT*), gen de la enzima Hierro superóxido-dismutasa (*FeSOD*), gen de la proteína ficocianina (*PcA*), proteína chaperona para la maquinaria del material genético (*DnaK*), desaturasa para la biosíntesis de ácidos grasos (*fabZ*) y gen de referencia (*16S*).

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Caracterización del crecimiento

Los cultivos de *Arthrospira maxima* presentaron una curva de crecimiento de 28 días, esto es mayor a lo obtenido por Oliveira *et al.* (1999) y por Mexia-Bernal (2011) al cultivar *Spirulina maxima* a 25 °C y al cultivar *Arthrospira maxima* en agua de mar a una irradiancia de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ismaiel y Piercey-Normore (2020) encontraron que *Arthrospira platensis* se encuentra estresada cuando es cultivada a 23 °C lo cual pudo haber determinado el tiempo de crecimiento de los cultivos de *Arthrospira maxima*, lo que es importante dado que se requirió un mayor tiempo para alcanzar la cantidad apropiada de biomasa para realizar la evaluación de fotosíntesis y para obtener buenos rendimientos al extraer el ARN total de la biomasa. No obtener una cantidad apropiada de biomasa puede afectar el rendimiento de la extracción de ARN porque al obtener más biomasa se encontrará mayor cantidad de ARN en la muestra que posteriormente se irá perdiendo en el mismo proceso de extracción.

Mediante los conteos de filamentos, se registró en la curva de crecimiento y se observó una disminución del crecimiento en el día 14, la cual se volvió a presentar en días subsecuentes. Esto puede estar relacionado al ciclo de vida del género *Arthrospira* el cual se distingue por el desarrollo de necridios, los cuales son células especializadas en el interior del filamento que están programados para morir, sufren lisis celular y el contenido citoplasmático es liberado al medio (Ciferri, 1983) y puede ser aprovechado por filamentos en crecimiento para su pleno desarrollo.

En esta investigación se encontró para *Arthrospira maxima* una fase de aclimatación de 3 días. Esto estuvo directamente relacionado con las condiciones medioambientales del cultivo, cantidad de inóculo, y características genéticas de la cepa evaluada. También, los mayores valores de la tasa de crecimiento se obtuvieron en los días 3 y 4.

La evaluación del crecimiento de *Arthrospira maxima* realizada por medio de conteo de filamentos presentó mayor variación, con respecto a la evaluación por densidad óptica, esta diferencia pudo ser debida a que el tamaño de los filamentos se modifica respecto a la fase de crecimiento y pudo influir en la evaluación del conteo por lo que se recomienda evaluar el crecimiento de *Arthrospira maxima* por densidad óptica más que por conteo de filamentos.

Los cultivos de *Arthrospira maxima* presentaron una tasa de crecimiento acumulada de  $2.7 \pm 0.03$  divisiones por día a los 7 días de cultivo y una tasa máxima de crecimiento de  $0.61 \pm 0.39$  divisiones día<sup>-1</sup>, los cuales son valores mayores a lo reportado por Mexia-Bernal (2011), quien obtuvo una tasa de crecimiento acumulada de  $2.4 \pm 0.83$  divisiones por 7 días y tasa máxima de crecimiento de  $0.39 \pm 0.16$  divisiones día<sup>-1</sup> utilizando la misma especie, con las mismas condiciones de luz, pero con diferente medio de cultivo (medio "S" *Spirulina*) con agua de mar y a una temperatura de 23 °C, el cual principalmente difiere del medio utilizado en el presente estudio por la cantidad de bicarbonato el cual es 4 veces menor en el medio "S" para *Spirulina*. El crecimiento de las cianobacterias, en general, depende de la magnitud las diversas variables de cultivo como la temperatura, el pH, la irradiancia, composición espectral de la luz y el tipo del medio de cultivo aunado a las características propias de cada especie microalgal (Nwoba *et al.*, 2019).

El pH presentó una relación directa con la edad del cultivo de *Arthrospira maxima*. Los resultados obtenidos en la variación de los valores del pH con respecto a la edad del cultivo concuerdan con lo obtenido por Oliveira *et al.* (1999). *Arthrospira maxima* y el congénere *Arthrospira platensis*, requieren de un nivel de pH elevado (9.5 – 11.0) para su cultivo adecuado. Evaluar un incremento en los valores de pH de los cultivos de *Arthrospira maxima* con respecto al tiempo de cultivo, puede indicar que, para su crecimiento, esta especie requiere de una gran cantidad de bicarbonato con respecto a la cantidad de otros elementos dentro del medio de cultivo puesto que, en el bicarbonato causa una mayor alcalinidad (Ismail *et al.*, 2016).

Al evaluar el crecimiento de *Arthrospira maxima* por medio de la densidad óptica a 550 nm, resultó que se describe mejor el crecimiento de los cultivos, respecto a lo obtenido con las mediciones a 680 nm. Esto puede deberse a que la clorofila a (Cl-a) tiene dos picos de absorción, el primero a 440 y el segundo a los 675 nm (Park y Dinh, 2019) y el haber medido el crecimiento a los 680 nm pudo haber interferido con los cambios en la cantidad de Cl-a. Al realizar las mediciones del crecimiento por medio de la densidad óptica a 550 nm, se evitaban los picos de absorción de la Cl-a. Sin embargo, existe literatura reciente que señala que para realizar mediciones espectrofotométricas, la longitud de onda seleccionada debe tener un pico de gran amplitud espectral para que las variaciones en las lecturas de la absorbancia no sean debidas a pequeñas variaciones en la longitud de onda (del Río-Portilla y Beaumont, 2008).

En *Arthrospira maxima*, la clorofila a (Cl-a) es la proteína fotosintética más importante, pero no la más abundante, debido a que se encuentra en el centro de reacción siendo el último pigmento fotosintético en el proceso de transporte de energía, y mediante la Cl-a, la fijación del carbono puede realizarse

apropiadamente durante la fotosíntesis (Li y Chen, 2015; Kannaujiya *et al.*, 2020). Por lo que entre más densos se vuelvan los cultivos de *Arthrospira maxima*, se requerirá más Cl-a para cubrir las demandas energéticas del microorganismo.

La cantidad de Cl-a está en función de la cantidad de luz que incide por unidad de área superficial del filamento, por lo que la cantidad de luz disminuye con forme la densidad del cultivo aumenta por un efecto de autosombreado (Dubinsky *et al.*, 1994). El trabajo de Olaizola y Duerr (1990) sustenta el principio antes mencionado, ya que demuestra que el contenido de Cl-a en el género *Spirulina* es mayor cuando la cantidad de luz que irradia a las células es menor.

A partir de los trabajos de Dubinsky *et al.* (1994) y Olaizola y Duerr (1990) aunados a lo obtenido en este trabajo, se concluye que el mayor contenido de Clorofila a y carotenos se obtendrá en cultivos maduros debido a un efecto de autosombreado.

Las variables clave involucradas en la cantidad de pigmentos es la intensidad y composición espectral de la luz. En este contexto, la cantidad de Cl-a y carotenos aumentó con forme a la edad del cultivo de *Arthrospira maxima*. La Cl-a tiene un rol importante en el primer paso del proceso de la fotosíntesis al recibir la energía lumínica que es interceptada por las ficobiliproteínas encargadas de la absorción química de la luz (Ciferri, 1983; Wahadoszamen *et al.*, 2020).

## **4.2 Axenización de los cultivos de *Arthrospira maxima***

Los cultivos de microorganismos fotoautótrofos, como las cianobacterias, suelen presentar una interacción simbiótica tipo mutualística con bacterias heterotróficas. Las bacterias heterotróficas asociadas a los cultivos de microalgas y cianobacterias prosperan a partir de un intercambio constante de metabolitos, vitaminas, sideróforos y materia orgánica disuelta (Yao *et al.*, 2018).

La manipulación del crecimiento de bacterias heterotróficas mediante el medio de cultivo con antibióticos, así como de cianobacterias, afecta la tasa de crecimiento, composición bioquímica, producción de metabolitos y, el control de la carga de bacterias heterotróficas con antibióticos, es de utilidad en estudios fisiológicos, genéticos o estudios taxonómicos (Molina-Cárdenas *et al.*, 2016; Tapia-Gallardo, 2019).

#### 4.2.1. Primer coctel de antibióticos

Acorde a los resultados obtenidos en el primer ensayo de axenización, se encontró que es posible reducir la carga de bacterias heterotróficas a niveles no detectables hasta por 5 días utilizando la dosis media del primer coctel de antibióticos (neomicina:  $125 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina:  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomina:  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina:  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

La reducción de la carga bacteriana fue posible debido a el efecto combinado del mecanismo de acción de cada antibiótico, es decir, al efecto sinérgico del coctel de antibióticos. La aportación de la neomicina sobre las bacterias fue al unirse a la subunidad 30S ribosomal e interferir con la síntesis de proteínas (Schacht, 1975). El mecanismo de acción de ampicilina, antibiótico que pertenece a la familia de los  $\beta$ -lactámicos, fue inhibir la síntesis de peptidoglicano, lo cual indujo a una rápida autólisis bacteriana (Kaldalu *et al.*, 2004). Dependiendo de la cepa bacteriana, la estreptomina pudo haber efectuado diferentes mecanismos de acción, los cuales afectan la integridad de la pared celular, el metabolismo del ARN y puede llegar a inhibir la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 30S ribosomal (Spotts y Stanier, 1961) y por último, el mecanismo de acción de la kanamicina fue generar cambios conformacionales en los ribosomas lo cual induce ambigüedad en las lecturas de ARN mensajero (variación en los niveles de ARNm) (Garret y Min-Won, 1973).

Aunque el crecimiento de *Arthrospira maxima* se vio afectado significativamente por efecto del primer coctel de antibióticos en todos los tratamientos evaluados, los filamentos mantuvieron la capacidad de continuar el crecimiento y aumentar la densidad óptica del cultivo. Esto probablemente fue debido a que los filamentos de *Arthrospira maxima* presentan una pared celular de peptidoglicano como las bacterias que se pretendieron eliminar del cultivo con el coctel de antibióticos. *Arthrospira maxima* presenta 6 capas de peptidoglicano lo que le confiere una ventaja frente a los antibióticos empleados.

Los resultados obtenidos muestran que se obtuvo crecimiento de *Arthrospira maxima* a pesar del uso del coctel de antibióticos en distintas dosis y esto resultó con mecanismos de acción combinados lo que resultó positivo para logra la reducción de la carga bacteriana. El resultado observado en una electroforesis de la extracción de ARN total, alentó la búsqueda de una nueva formulación de un coctel de antibióticos que permitiera: (1) la reducción de la carga de bacterias heterotróficas, (2) el aumento de la densidad óptica de *Arthrospira maxima* y que, a su vez, (3) no afectara la cantidad y fidelidad de la cuantificación del nivel de genes transcritos en ARNm.

#### 4.2.2 Segundo coctel de antibióticos

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de axenización con el primer coctel de antibióticos, se procedió a formular un segundo coctel de antibióticos basados en los resultados obtenidos por Sena *et al.* (2011), quienes diseñaron una estrategia para lograr la axenización de *Arthrospira maxima*.

Mediante este nuevo coctel de antibióticos, se demostró la posibilidad de reducir la carga de bacterias heterotróficas hasta por 7 días utilizando la dosis media de ampicilina, cefoxitina y penicilina G (ACP) cada uno a  $112.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  y también fue posible reducir la carga de bacterias heterotróficas por la misma cantidad de tiempo utilizando la dosis baja del coctel de antibióticos ( $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) de ACP.

El número de días que se logró obtener cultivos axénicos de *Arthrospira maxima* mejoró 1.75 veces con respecto a lo obtenido con el primer coctel de antibióticos. El tiempo de mantenerse axénicos los cultivos fue mayor a lo obtenido por Sena *et al.* (2011) al axenizar la cepa Lefevre de *Arthrospira maxima* con una formulación muy similar al coctel 2 del presente estudio y fue mayor a lo obtenido por Tapia-Gallardo (2019) al axenizar cultivos de tres especies de *Chaetoceros* utilizando los mismos antibióticos del segundo ensayo de axenización.

El aumento en la cantidad de días sin carga detectable de bacterias heterotróficas probablemente fue debido a la presencia del antibiótico cefoxitina, el cual es un poderoso antibiótico de la familia de los  $\beta$ -lactámicos y esta familia de antibióticos se distingue por el mecanismo de acción de inhibir la síntesis de la pared celular de bacterias (Madigan *et al.*, 2003). En adición, Sena *et al.* (2011), mediante un diseño rotatorio compuesto central (CCRD) de  $2^4$  factores, encontraron al antibiótico cefoxitina como aquel con mayor efectividad.

En un estudio relacionado con diversas especies de microalgas se encontró que los valores de Fv/Fm varían de 0.43 a 0.72 y que esto está en dependencia de los distintos géneros de las especies: *Chlorophyta* (0.71) > *Cryptophyta* (0.62) > *Bacillariophyta* (0.60) > *Xanthophyceae* (0.54) > *Pyrrophyta* (0.51) (Tan *et al.*, 2019). En un estudio realizado con *Arthrospira maxima* en donde se evaluó el efecto de la adición de distintos aportes químicos de bicarbonato, se encontraron valores de Fv/Fm en el tratamiento control con bicarbonato de sodio de 0.42 a 0.52, mientras que con la adición de borato de sodio, nitrato de sodio y sulfato de potasio los valores de Fv/Fm estuvieron en valores de 0.25 a 0.38 (Ananyev *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo con *Arthrospira maxima* muestran una disminución en los valores de Fv/Fm con el uso del coctel de antibióticos ACP (Fv/Fm: 0.095 a 0.125) respecto al tratamiento control (0.301), y que las distintas concentraciones del coctel ACP causaron estrés en las células de forma similar a lo descrito por (Ananyev *et al.*, 2018) al utilizar distintas formas químicas para el sistema de bicarbonatos.

La presente investigación es la primera en evaluar el nivel de estrés fisiológico del microorganismo fotoautótrofo *Arthrospira maxima* en términos del rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) cuando esta cianobacteria es cultivada con diferentes dosis de un coctel de antibióticos con el objetivo de generar un cultivo axénico.

Debido al estrés fisiológico causado por el segundo coctel de antibióticos, y aunado a que se reporta una fase de latencia de 16 días para volver a obtener un crecimiento de *Arthrospira maxima* óptimo para poder extraer cantidades aceptables de ARN utilizando la formulación del segundo coctel (Sena *et al.*, 2011).

### **4.3 Efecto de la composición espectral de la luz**

#### **4.3.1 Crecimiento y parámetros poblacionales**

El número de fotones en la longitud de onda del color azul o en la longitud de onda del color rojo, que pueden ser capturados por una sola molécula de Cl-a en una célula vegetal, depende de la arquitectura celular, composición pigmentaria, el arreglo del cloroplasto, o bien, depende también de los tilacoides en el caso de las cianobacterias (Schulze *et al.*, 2014). Esta causalidad tuvo efecto en el crecimiento de *Arthrospira maxima* al ser evaluada la luz roja como aquella que produjo un mayor número de filamentos y de peso seco.

En estudios sobre la evaluación del efecto de la composición espectral de la luz en el crecimiento de distintas especies de *Spirulina* y de *Arthrospira platensis* se ha obtenido que las luces que mejor promueve el crecimiento es la luz roja, naranja, verde, o bien, una combinación de luz roja y luz azul. Según la literatura, la tendencia de mejor crecimiento originado por la luz roja en como lo reportado en el presente estudio, no debería cambiar con altas irradiancias de hasta  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Chen *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2011; da Fontoura *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que para *Arthrospira maxima* la luz roja favorece el crecimiento (Park y Dinh, 2019). En esta investigación la tasa de crecimiento evaluada en la luz roja ( $0.535 \pm 0.49$  divisiones día<sup>-1</sup>) fue similar a la obtenida ( $0.542$  divisiones día<sup>-1</sup>) por Sang-Hyo *et al.* (2016) en *Spirulina platensis* cultivada con luz roja a  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con pico máximo espectral a los 660 nm. Sin embargo, la tasa de crecimiento evaluada en luz azul ( $0.326 \pm 0.56$  divisiones día<sup>-1</sup>) fue casi el doble de lo reportado ( $0.192$  divisiones día<sup>-1</sup>) para cultivos de *Spirulina platensis* en luz azul con pico máximo espectral a los 440 nm por Sang-Hyo *et al.* (2016).

La luz azul con irradiancia de  $42.15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fue la que mejor estimuló el crecimiento para *Spirulina fusciformis* (Madhyastha y Vatsala, 2007). Lo antes mencionado apoya la idea de que no existe un patrón estándar de respuesta a la composición espectral de la luz para todas las especies de cianobacterias o inclusive en los miembros del género *Arthrospira*.

La especie *Arthrospira maxima* pertenece a las cianobacterias filamentosas y carece de clorofila b (Ciferri, 1983), lo que impide que la célula pueda aprovechar la energía de la luz de 420 a 470 nm de longitud de onda (Marriott y Blankenship, 2011).

Los resultados obtenidos con *Arthrospira maxima* en esta investigación muestran que, debido a la falta de capacidad para aprovechar eficientemente la energía de la luz de color azul, el tratamiento experimental con luz azul fue en el que se presentaron los valores menores de la tasa de crecimiento ( $0.33 \pm 0.01$  divisiones día<sup>-1</sup>) y con los filamentos de tamaño más cortos ( $220 \pm 127 \mu\text{m}$ ) y con el menor peso seco orgánico ( $355 \pm 21.48 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Anteriormente se había mencionado la discordancia en la literatura acerca de si el género *Arthrospira* posee clorofila b o no (Ciferri y Tiboni, 1985; Hynstova *et al.*, 2018), sin embargo, nuestros resultados señalan que el crecimiento de *Arthrospira maxima* fue el menor cuando fue cultivada con luz azul ( $\lambda$ : 420-470 nm). Lo anterior confirma que el microorganismo de estudio carece de clorofila b puesto que la clorofila b absorbe las longitudes de onda de la luz azul.

A diferencia de las algas verdes y rojas, las cianobacterias no pueden aprovechar eficientemente la luz azul probablemente debido a que muchas especies de cianobacterias perdieron la clorofila b durante el proceso evolutivo (Schulze *et al.*, 2014). En contraparte, las algas verdes no pueden aprovechar la luz verde y amarilla debido a que perdieron las ficobiliproteínas durante la evolución (Marriot y Blankenship, 2011). Otras microalgas como aquellas del género *Chlamydomonas* que poseen ambas clorofilas (a y b) presentan la capacidad de fotoaclimatarse realizando un cambio pigmentario modificando la proporción de clorofila a:b cuando *Chlamydomonas* es cultivada con luz azul (Hess y Tolbert, 1967).

En el presente trabajo se encontró que, aunque *Arthrospira maxima* absorbe la luz azul, esta cianobacteria utiliza la luz azul menos eficientemente para realizar el proceso fotosintético comparativamente con la luz verde, roja o blanca. Una posible explicación para este proceso es que la luz azul no es absorbida por los ficobilisomas, como ocurre en la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803, y, por lo tanto, causa una excitación deficiente del fotosistema II (PSII) (Luimstra *et al.*, 2020).

Luimstra *et al.* (2020) encontraron que al cultivar a *Synechocystis* sp. PCC 6803 (una cianobacteria unicelular que presenta ficobilisomas al igual que *Arthrospira maxima*) con luz azul presentó una sobreexpresión de los genes del PSII, lo que mejoró la distribución de la excitación energética entre el PSII y el PSI. Inclusive, la baja tasa de crecimiento indicó que la sobreexpresión de los genes del PSII fue insuficiente para restaurar por completo el flujo fotosintético lineal de electrones. En contraparte, varios genes ribosomales y otros genes envueltos en la producción de proteínas fueron temporalmente subexpresados cuando la cianobacteria fue cultivada con luz azul.

### 4.3.2 Composición proximal

La composición proximal de *Arthrospira maxima* mantenida con luz de diferente composición espectral presentó diferencias significativas entre tratamientos, lo anterior indica que es posible manipular la composición de las células de *Arthrospira maxima* mediante la manipulación del espectro de la luz de los cultivos.

El contenido de lípidos evaluado para *Arthrospira maxima* en esta investigación mostró la siguiente proporción por tipo de luz: blanca (13.41%) > verde (12.06%) > azul (10.72%) > roja (8.63%). Los valores encontrados corresponden a valores similares a los obtenidos para *Spirulina platensis* al ser mantenida en cultivos con un gradiente de irradiancia de lámparas fluorescentes de luz blanca (170 a 870  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y temperatura de 25 a 38 °C (Tedesco y Duerr, 1989). El contenido de lípidos en los cultivos de *Spirulina* sp. fue modificado por efecto de la distinta composición espectral de luz, del fotoperiodo (12:12 luz:oscuridad) y de la irradiancia (500 a 3200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), resultando en valores mayores en luz verde (10.45 a 13.24%), respecto a lo obtenido en luz roja (10.45-12.19%) y luz azul (10.45-11.92%) (da Fontoura *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en esta investigación con *Arthrospira maxima* resultaron similares a los descritos por

da Fontoura *et al.* (2018) para luz verde y azul, pero es muy importante destacar que en la investigación antes mencionada la irradiancia utilizada fue entre 1000 a 6400 veces menor que la utilizada en el presente trabajo con *Arthrospira maxima* ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Se ha descrito que diferentes especies de cianobacterias filamentosas como *Oscillatoria* sp. pueden modificar la producción de lípidos por efecto de la magnitud de la irradiancia y de la composición espectral de la luz (Sharmila *et al.*, 2018). El mayor contenido de lípidos en *Arthrospira maxima* cultivada con luz verde (12%) puede ser explicado por el aumento en la actividad enzimática de la anhidrasa carbónica y de la ribulosa bifosfato carboxilasa / oxigenasa (RuBisCO). Estas enzimas tienen un papel relevante en la regulación del ciclo del carbono en microalgas y presentan una tendencia dependiente del espectro de luz incidente (Eskins *et al.*, 1991). Futuros análisis de expresión de genes pueden contribuir a validar la relación entre el nivel de ARNm's de RuBisCO y la cantidad de lípidos en *Arthrospira maxima*.

Los valores del contenido de carbohidratos evaluados en los cultivos de *Arthrospira maxima* mostró la siguiente proporción por tipo de luz: luz roja (25.97%) > blanca (15.67%), verde (12.92%) y azul (10.36%), se encontró que los valores obtenidos para la luz roja y blanca fueron mayores de lo obtenido por Oliveira *et al.* (1999) ( $11.68\% \pm 0.81$ ) y por Mexia-Bernal (2011) (12%).

Markou (2014) evaluó que la luz azul produjo un mayor contenido de carbohidratos (11.3%) en *Spirulina platensis*. Sin embargo, en esta investigación se encontró que *Arthrospira maxima* cultivada con luz roja fue la condición experimental que produjo el mayor contenido de carbohidratos (25.97%) que fue más del doble encontrado por Markou (2014).

El menor contenido de carbohidratos obtenido en esta investigación con *Arthrospira maxima* expuesta a luz azul, puede ser debido a que la luz azul es responsable de la promoción de la actividad de enzimas respiratorias en plantas y en microalgas (Ruyters, 1984). Por lo anterior, con la luz azul se promueve un incremento en la concentración y actividad de estas enzimas respiratorias en forma proporcional a la tasa de catabolismo de carbohidratos, por lo tanto, lo anterior se produce a una reducción del contenido de carbohidratos.

El mayor contenido de carbohidratos en los cultivos de *Arthrospira maxima* fue evaluado con luz roja (25.97%) y estos valores pueden estar asociados con la mayor producción de ficocianina ( $7.63 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) evaluada en los cultivos mantenidos con este tipo de luz. Tardu *et al.* (2016) encontraron mediante la técnica RNA-seq que en algas rojas (algas que presentan ficobiliproteínas como las cianobacterias), los espectros de luz azul y roja promueven la mayor expresión diferencial del metabolismo de carbohidratos,

resultando en 42 genes que presentaron una variación significativa en su nivel de expresión. Lo anterior muestra que existe un mecanismo molecular de adaptación en el cambio de la composición proximal de *Arthrospira maxima* cuando ésta es expuesta a luces de diferente composición espectral.

El contenido de proteínas evaluadas en los cultivos de *Arthrospira maxima* mostró la siguiente proporción por tipo de luz: verde 64.27%, blanca 63.32%, azul 60.20% > roja 44.29%, estos valores fueron menores que lo obtenido por Oliveira *et al.* (1999) ( $68.01 \pm 4.35\%$ ) al cultivar *Spirulina maxima* a 25 °C en luz blanca fluorescente con irradiancia de  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Sin embargo, la concentración obtenida de proteínas en la luz verde fue mayor que lo obtenido por da Fontoura *et al.* (2018) ( $61.79 \pm 1.9\%$ ) al cultivar *Spirulina sp.* con 12 h luz verde fluorescente y 12 h luz verde LED a una irradiancia de 500 a  $3200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los valores encontrados para *Arthrospira maxima* en esta investigación con luz blanca (63.32%) y luz azul (60.20) resultaron similares a los obtenidos por Mexia-Bernal (2011) (60.73%) al cultivar *Spirulina maxima* con luz blanca fluorescente a la misma irradiancia ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con medio "f" en agua de mar.

A diferencia del efecto de la composición espectral de la luz en el contenido de carbohidratos y lípidos, las variaciones en el contenido de proteínas fueron mucho más especie-específicas. Debido a que inclusive dentro de las cianobacterias las proteínas captadoras de luz, las ficobiliproteínas pueden variar en su número, distribución y estructura molecular (Green, 2019).

En cultivos de la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803 al exponerla con luz azul, se presentó un efecto supresor en varios genes ribosomales y otros genes relacionados con la síntesis de proteínas, resultando en un bajo contenido de proteínas. De manera contrastante, Markou (2014) y da Fontoura *et al.* (2020) obtuvieron la mayor producción de proteínas al cultivar con luz roja las cianobacterias *Arthrospira platensis* y *Spirulina sp.* LEB 18 en cultivos expuestos en altos valores de irradiancia ( $500$  a  $3200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

El efecto de la luz azul en los cultivos de cianobacteria *Cyanobium sp.* no presentó efecto promotor de síntesis de proteínas, aunque los cambios en la cantidad de ficocianina sugirieron que el contenido de proteínas presentó una mayor proporción (Pagels *et al.*, 2020). Los resultados mencionados resultan similares a lo evaluado con *Arthrospira maxima* en la presente investigación, ya que la luz azul promovió bajos valores de proteínas (60.20%) respecto a lo obtenido en los cultivos con luz verde (64.27%) o blanca (63.32%) y también se encontró un alto contenido de ficocianina en luz azul ( $6.69 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

De acuerdo con Schulze *et al.* (2014) las cianobacterias usan principalmente la clorofila a (430 – 680 nm) y las ficobiliproteínas (550 – 620 nm) para la captura de la energía de la luz. Por lo anterior, los espectros de luz en los intervalos del rojo y verde pudiesen ser mejor aprovechadas y podrían favorecer la producción de biomasa y síntesis de proteínas como se encontró en este estudio para la luz verde (64.27%), blanca (63.32) y azul (60.20%), respecto a lo obtenido con luz roja (44.29%).

El efecto de la composición espectral de la luz y composición proximal de *Arthrospira máxima* queda definido como un proceso complejo, el cual puede no estar enteramente relacionado a la ruta fotosintética. Sin embargo, dicho efecto puede estimular cambios en los fotorreceptores y en otros procesos celulares como la activación de enzimas o bien, la transcripción de genes. Nuestros resultados muestran que al usar ciertos intervalos del espectro de luz para cultivar *Arthrospira máxima*, se producen cambios en la composición proximal que puede ser utilizados para modificar la calidad de la biomasa según los requerimientos en la industria acuícola, nutracéutica o cosmeceútica.

#### 4.3.2 Pigmentos y fotosíntesis

Las cianobacterias carecen de clorofila b en su gran mayoría, por lo que utilizan para la absorción de la luz a la clorofila a y otros pigmentos accesorios. La clorofila a presenta una curva bimodal con dos picos máximos de absorción a 430 y 680 nm de longitud de onda. Las cianobacterias también cuentan con un complejo encargado de cosechar la luz llamado ficobilisoma formado por la proteína ficoeritrina con pico máximo de absorción a 550 nm, la proteína aloficocianina con pico máximo de absorción a 660 nm y la proteína ficocianina con pico máximo de absorción a 620 nm. La integración de la absorción electromagnética de cada pigmento primario y secundario contenido en cada filamento, confiere la habilidad a *Arthrospira maxima* de utilizar la energía de la luz en el espectro roja, amarilla y verde (Schulze *et al.*, 2014).

Los valores más altos en el contenido de clorofila a para *Arthrospira maxima* obtenidos en este estudio fueron con luz blanca ( $0.95 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) > azul ( $0.37 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y verde ( $0.23 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) > roja ( $0.18 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Estos resultados contrastan de lo obtenido por Park y Dinh (2019) para la misma especie, ya que ellos evaluaron la mayor concentración de clorofila a en *Arthrospira maxima* al cultivarla con luz verde cultivada en un gradiente de irradiancia (5, 10, 30, 60 y  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Markou (2014) obtuvo la mayor concentración de clorofila a en *Arthrospira platensis* al cultivarla con luz azul en fotobiorreactores a 30 °C y con una irradiancia de 9 klux. En la presente investigación se encontró que la luz roja presentó la menor concentración de clorofila a, en otras investigaciones se ha encontrado que para *Arthrospira platensis* la luz de color anaranjada incrementa la producción de clorofila a y carotenoides respecto a lo obtenido con luz color blanco (Kumar *et al.*, 2021). Sin embargo, se ha evaluado que en *Arthrospira platensis* una combinación de 80% de luz roja y 20% de luz azul mantenidas con una irradiancia de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  favorece la producción de clorofila a (Lima *et al.*, 2018).

En esta investigación se encontró la producción más elevada de ficocianina (7.63  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) en *Arthrospira maxima* al ser cultivada con luz roja. Este incremento en este tipo de luz se debió, posiblemente, a que la ficocianina absorbe la energía lumínica en longitudes de onda cercanas al rojo y teniendo como pico de absorción los 640 nm, como se ha descrito por Kannaujiya *et al.* (2020).

Para *Spirulina platensis* cultivada con luz roja o luz rojo lejano se observó un incremento en la concentración de ficocianina (Swarc *et al.*, 2020). Otros autores mencionan que al mantener cultivos de *Arthrospira maxima* con luz azul se produce un aumento en la producción de ficocianina (Park y Dinh, 2019). Sin embargo, otros mencionan que para *Spirulina* sp. en cultivos con luz verde (12 h a 3200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con 6 h a 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 6 h de oscuridad) y a 30 °C se incrementó la cantidad de ficocianina (da Fontoura *et al.*, 2018).

Existen investigaciones en donde se han evaluado los cambios inducidos por la luz de diferentes composición espectral (azul, verde, amarillo, anaranjado y rojo) respecto a la cantidad de ficocianina y la composición bioquímica de distintas especies del género *Arthrospira*. Sin embargo, con fines de investigación fotobiológica, son pocos los estudios que presentan los espectrogramas o los parámetros espectrales principales en la que fueron cultivadas las diferentes cepas del género *Arthrospira* (Park y Dinh, 2019; Al-Saman *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021).

Para los cultivos de *Arthrospira maxima* mantenidos con luz blanca en esta investigación, se encontró que la concentración de ficocianina evaluada ( $7.73 \pm 2.53 \text{ mg ml}^{-1}$ ) fue 38 veces mayor, respecto a lo obtenido para *Spirulina platensis* (0.178 y 0.209  $\text{mg ml}^{-1}$ ) en cultivos con luz blanca, esto es debido a la posición del máximo valor de irradiancia de la luz roja con la que fue irradiada *Spirulina platensis* y que corresponde con un máximo de irradiancia en 660 nm de longitud de onda (Sang-Hyo *et al.*, 2016). Se conoce que el pigmento principal de las cianobacterias del género *Arthrospira* es la ficocianina y ésta tiene un máximo de absorción a los 640 nm de longitud de onda (Kannaujiya *et al.*, 2020). En el presente estudio se

emplearon lámparas rojas (Industrial F40T12/R), con el máximo de irradiancia en los 639 nm de longitud de onda, encontrando que el máximo valor de ficocianina fue medido en el tratamiento con luz roja, por lo que una herramienta útil para modular el contenido de ficocianina puede resultar por la correspondencia del pico de absorción del pigmento principal (ficocianina) y del pico de transmitancia de la fuente de luz (luz roja).

Con el propósito de maximizar la eficiencia fotosintética, todos los fotones emitidos por una fuente de luz deben ser capturados por el aparato fotosintético microalgal. Existe una estrategia para alcanzar un alto nivel de utilización de la luz, esta estrategia es el completo emparejamiento espectral de una fuente de luz al espectro de los pigmentos fotosintéticamente activos (Zeinalov y Maslenkova, 2000). Por lo anterior, la determinación del espectro fotosintéticamente activo (PAR) para grupos taxonómicos específicos, puede ayudar a estimar la calidad de luz requerida por una especie perteneciente a determinado taxón para inducir cambios específicos en la síntesis de pigmentos.

Otra evidencia de este patrón de relación entre la posición del máximo de irradiancia emitido por cada lámpara y la fotoestimulación para producir una mejora en el desempeño biológico, se encuentra en el trabajo de Kumar *et al.* (2021). Estos autores presentan los espectrogramas de las condiciones experimentales de luz empleadas y la condición de luz que promovió la mayor de producción de biomasa fue el tratamiento con luz color naranja filtrada mediante hojas traslúcidas de polivinil. Los principales pigmentos de las células de *Arthrospira*, las ficobiliproteínas, absorben la luz en longitudes en un rango espectral amplio de 500 a 650 nm y que corresponden al intervalo de las longitudes de onda de la luz utilizada (Park y Dinh, 2019). La luz filtrada color anaranjado aporta más energía en la posición de las longitudes de onda del color verde, lo cual permite abastecer de energía que es fácilmente aprovechable por el ficobilisoma en vez de sólo abastecer una fracción del rango espectral que pueden absorber las cianobacterias del género *Arthrospira* y de esta forma toda la energía filtrada en los rangos espectrales específicos es aprovechada por el ficobilisoma y se traduce en una mayor producción de biomasa.

Park y Dinh (2019) demostraron que la luz filtrada es una factibilidad económicamente viable y un método práctico de aplicar luz de baja intensidad en un espectro específico de luz en cultivos microalgales a gran escala, esto permite a las células enriquecerse en compuestos de alto valor agregado programando el metabolismo microalgal desde la fuente de luz. El uso de luz filtrada es una técnica ampliamente recomendada para implementar cultivos microalgales en escala industrial (Patelou *et al.*, 2020).

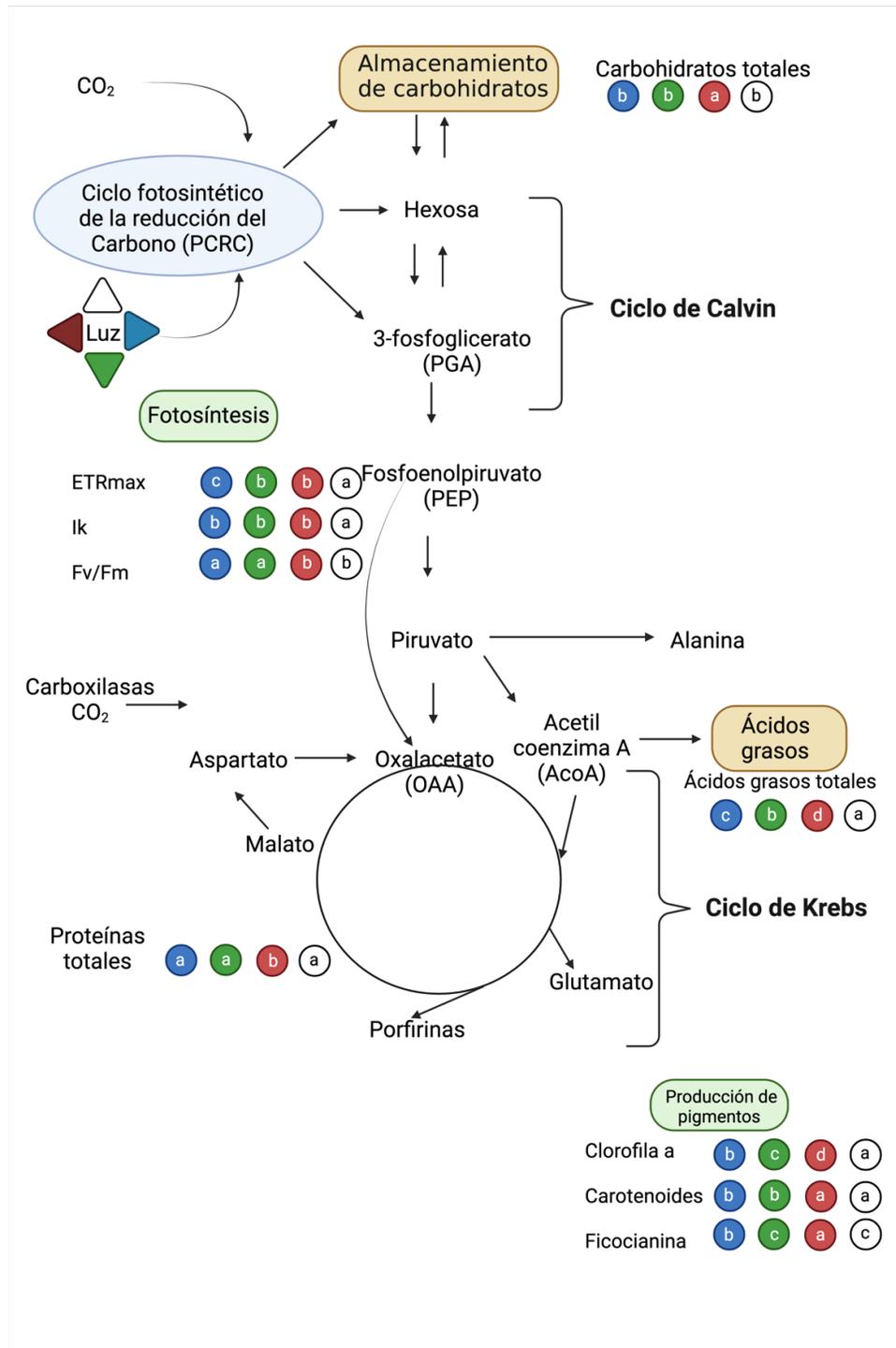
Los valores de la máxima producción fotoquímica ( $F_v/F_m$ ) de *Arthrospira maxima* evaluados en esta investigación (0.26 a 0.33), resultaron en valores similares o menores a los obtenidos por Park y Dinh (2019) para la misma especie en cultivos mantenidos con un gradiente de irradiancia (5, 10, 30, 60 y 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de luz azul (0.44 a 0.54), luz verde (0.28 a 0.43), roja (0.28 a 0.40) y blanca (0.25 a 0.39) a 25 °C, salinidad de 20 y ciclo luz oscuridad de 12:12.

Las curvas rápidas de luz generadas a partir de la relación de la tasa de transporte de electrones (ETR) con la radiación fotosintéticamente activa, mostraron que con la radiación máxima evaluada (1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no fue lo suficientemente elevada como para causar fotoinhibición del fotosistema II. Esta ausencia de inhibición en las curvas rápidas de luz era esperada, debido a que previamente se ha descrito que *Arthrospira maxima* puede tolerar valores de 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Park y Dinh, 2019).

Sang-Hyo *et al.* (2016) recomiendan para futuras investigaciones con *Arthrospira maxima* evaluar el efecto de suplementar luz con diferentes longitudes de onda simultáneamente, ya que con *Arthrospira platensis* se obtuvo un incremento en la tasa de crecimiento y en la producción de ficocianina. Al considerar los resultados obtenidos en esta investigación con *Arthrospira maxima*, se propone evaluar el efecto en la luz verde y roja provistas de forma simultánea respecto a la cantidad de ficocianina y proteínas.

Un punto importante para considerar en los estudios de relacionados con la composición espectral de la luz es que debe considerarse el nivel de la irradiancia utilizada, ya que diversos trabajos (Olaizola y Duerr, 1990; Sang-Hyo *et al.*, 2016; Park y Dinh, 2019) encuentran desviación de rutas metabólicas de síntesis por el efecto combinado de la composición espectral y de la irradiancia.

El metabolismo de *Arthrospira maxima* es compensatorio, es decir, cuando esta microalga es mantenida con diferente composición espectral de la luz, se promueve la síntesis de metabolitos específicos a expensas de la biosíntesis de otros (Figura 27). Por lo que no podría ser posible que *Arthrospira maxima* en uno de los tratamientos se promueva la producción de proteínas, de carbohidratos y también de lípidos.



**Figura 28.** Cambios inducidos por efecto de la composición espectral de la luz en las principales rutas metabólicas del Carbono en *Arthrospira maxima*. El círculo azul (●) corresponde al tratamiento con luz azul, el círculo verde (●) corresponde a luz verde, el círculo rojo (●) corresponde a luz roja y el círculo blanco (○) corresponde a luz blanca. Análisis de varianza de una vía (ANOVA)  $\alpha=0.05$  y prueba *a posteriori* de Tukey HSD. Las letras dentro de los círculos indican las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos  $a>b>c>d$ . Abreviaciones:  $\text{CO}_2$ : dióxido de Carbono, ETRmax: máxima tasas de transporte de electrones, Ik: Irradiancia de saturación, Fv/Fm: máximo rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II, *rbcl*: Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, GOGAT: Glutamato sintasa, *PcA*: Subunidad Alfa de ficocianina. Figura modificada de Sánchez-Saavedra y Voltolina (1994).

## 4.4 Estandarización de análisis de expresión génica

La validación y reproducibilidad de los estudios de expresión génica dependen en gran medida de la cantidad y calidad del ARN extraído y el grado de contaminación por ADN genómico. Las cianobacterias presentan desafíos particulares en el aislamiento de ácidos nucleicos debido a que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios (Dittman *et al.*, 2001), estos metabolitos secundarios como exopolisacáridos, policétidos y alcaloides que pueden perjudicar la extracción y la purificación de ácidos nucleicos (Tillet y Neilan, 2000).

Los cambios en la expresión de los genes tienen un papel crítico en la habilidad que tienen las cianobacterias de adaptarse a los cambios ambientales. Los cambios inducidos por el efecto de la composición espectral de la luz pueden medirse a nivel transcriptómico y para ello es necesario realizar una correcta estandarización de los procedimientos.

Después de realizar varias búsquedas de literatura especializada en la expresión génica de microalgas se encontró que existe una falta de información de los pasos clave necesarios para la realización de un correcto estudio del perfil transcriptómico independientemente de la técnica; ya sea por PCR cuantitativa, en tiempo real qPCR (Heid *et al.*, 1996), o bien, por secuenciación del repertorio completo de transcritos RNA-Seq (Wang *et al.*, 2009). En la presente investigación se abordó la estandarización por la correcta evaluación del nivel de expresión génica de 7 diferentes genes (*HSP90*, *rbcl*, *GOGAT*, *FeSOD*, *PcA*, *dnaK*, *fabZ*), y un octavo gen utilizado como gen de referencia (16S ARNr) en *Arthrospira maxima* mediante la técnica qPCR.

### 4.4.1 Toma de muestra

En primera instancia, para realizar un análisis de expresión de genes en cianobacterias se debe considerar la toma de muestra. Esta parte es importante porque una buena provisión de la cantidad de muestra necesaria ayudará a evitar problemas de bajo rendimiento en la extracción de ácidos en general, y más específicamente, de cantidad de ARN total extraído. La provisión de la cantidad de muestra también ayudará a calcular cuantos genes será posible evaluar, ayudará también en la estandarización de cada uno de los cebadores (oligonucleótidos) necesarios para cada uno de los genes a evaluar y por último ayudará a realizar las curvas de eficiencia la cual debe contemplar ARN de cada tratamiento experimental.

Para evitar problemas de bajos rendimientos de ARN, Byung-Hyuk *et al.* (2006) proponen que la toma de muestra se de 3 ml del cultivo de la microalga de interés, pero de un cultivo de 2 semanas de edad. En la presente investigación se utilizaron 5 ml de cultivo de *Arthrospira maxima* en fase exponencial de un cultivo de 5 días lo cual fue negativo para el rendimiento de la extracción de ARN por lo que se recomienda que la muestra para realizar extracciones de ARN de *A. maxima* cultivada a 23 ° C sea de no menos de 15 días.

#### **4.4.2 Extracción**

Se han propuesto varios métodos para la extracción y purificación del ARN de células de cianobacterias, los cuales pueden ser elegidos acorde al sistema (o protocolo) elegido para romper las células. Estos son lisis celular mecánica, mediante agitación con perlas (Cardinali *et al.*, 2000), lisis enzimática de la pared celular (Varma y Kwon-Chung, 1991) y la permeabilización usando agentes caotrópicos (Holm *et al.*, 1986). Aunado a esto, los métodos tradicionales para la extracción de ácidos nucleicos de cianobacterias requieren grandes cantidades de células debido a los bajos rendimientos (Nakajima *et al.*, 2000). En relación a los resultados obtenidos se puede confirmar que el método de lisis celular y extracción de ARN es adecuado puesto que se obtuvieron resultados favorables en la estandarización de la extracción (resultados no publicados) sin embargo, las muestras para la extracción de ARN fueron de cultivos de *A. maxima* con muy baja densidad celular lo que afectó en el rendimiento de extracción.

El bajo rendimiento obtenido en las extracciones de ARN fue debido a la fase de crecimiento del cultivo puesto que aunque se utilizó el mismo volumen que en la estandarización de la extracción de ARN, el cultivo de las muestras experimentales tenía 5 días de crecimiento mientras que el cultivo de las muestras empleadas para la estandarización de la extracción de ARN tenían 28 días, lo que se traduce en una baja homogeneidad en los rendimientos de extracción de ARN.

#### **4.4.3 Purificación**

Las cianobacterias presentan una importante cantidad de polisacáridos que interfieren en la lisis celular y en la purificación de ácidos, mientras que son ricas en nucleasas e inhibidores de reacciones enzimáticas

(Wilkins y Smart, 1996). Lopes-Pinto *et al.* (2009) realizaron un estudio empleando diferentes métodos de extracción de ARN de cianobacterias donde encontraron que las variaciones a los protocolos de extracción, incluso manteniendo la misma química, tenían un impacto en la calidad y cantidad de ARN obtenido. También encontraron que se puede sustituir la maceración mediante agitación con perlas con calentamiento. Lo anterior es factible e incluso preferible debido a que el nivel de contaminación fue menor y el método no requiere de un homogeneizador costoso. En el presente estudio la maceración se realizó mediante un equipo FastPrep-24 5G MP Biomedicals utilizando perlas de zirconia de diámetro < 1 mm. La limpieza del ARN se realizó mediante el uso de la enzima ADNasa utilizando las instrucciones del fabricante, sin embargo, esto no dio buen resultado eliminando todas las moléculas de ADN remanentes en las extracciones de ARN debido a que posterior a la limpieza fue posible amplificar fragmentos de ADN mediante PCR de punto final.

Se sugiere tener especial cuidado a la hora de realizar este procedimiento debido a que existe un paso que es crucial en toda la metodología, este es la recuperación de todo el alcohol sin remover la pastilla de ácidos nucleicos al fondo del microtubo. Se recomienda practicar este paso las veces necesarias.

#### 4.4.4 Amplificación

Actualmente se conoce bien la composición bioquímica de *Arthrospira maxima* (Alano-Ragaza *et al.*, 2020). Sin embargo, los genes que codifican para las enzimas clave y otras proteínas funcionales que están involucradas en varias rutas metabólicas se encuentran muy poco estudiadas, excluyendo la ficocianina y algunos otros pocos genes p.ej. genes de proteínas involucradas con la respuesta antioxidante como: Transglutaminasa, Disulfuro reductasa de tiorredoxina, Peroxiredoxina, Glutación oxidoreductasa, Superóxido dismutasa (Kumaresan *et al.*, 2018); genes de proteínas involucradas en la fotosíntesis y fijación del carbono como: RuBisCO, Ficocianina (subunidad alfa y beta), Proteínas estructurales del núcleo del ficobilisoma, polipéptidos de unión al ficobilisoma (Kamath-Makund *et al.*, 2016); genes de proteínas involucradas en la producción de ácidos grasos poliinsaturados como: Delta desaturasa de ácido graso (*desC* y *desD*), (3R)-hidroximiristoilo- [proteína-transportadora-de acilo]-deshidratasa (*fabZ*) (Los *et al.*, 1997; Jeamton *et al.*, 2008); genes de proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa como: transportadoras de ATPasa (subunidades beta y delta) (Wang *et al.*, 2013) y un único gen de la proteína clave para el metabolismo del nitrógeno en *A. maxima*: Glutamato sintasa (*GOGAT*) (Ismail y Piercey-

Normore, 2020). Este es el primer reporte que utiliza 8 diferentes genes para evaluar la presencia de genes clave de las principales rutas metabólicas de *Arthrospira maxima*.

Las amplificaciones de los genes objetivo se lograron con éxito, sin embargo, no fue posible medir el nivel de expresión debido principalmente a dos factores. El primero de ellos es que no fue posible extraer una cantidad suficiente de ARN, aunque esto no es atribuido al kit de extracción de ARN empleado porque también fue utilizado en la estandarización de la extracción de ARN y se obtuvo una gran cantidad de ARN. El segundo factor que impidió evaluar el nivel de expresión de transcritos fue el hecho de que no se logró una correcta eliminación de ADN y posterior purificación del ARN.

#### **4.4.5 Genes de referencia**

El gen de referencia (16S) también presentó amplificación, la peculiaridad de este gen a comparación de los otros genes es que se obtuvo un valor de Cq mucho menor (entre 4 y 7 ciclos) al de los genes experimentales. Esto sucede porque es un gen ribosomal y se encuentra en mayor abundancia en comparación del resto de los genes. Por lo que se sugiere investigar otros genes de referencia con valores menores de Cq para la cuantificación de los niveles de expresión génica de esta especie.

Se sabe que el nivel de expresión de los genes que han sido empleados como genes de referencia no siempre tienen un nivel estable dentro de todas las condiciones experimentales evaluadas (Pinto *et al.*, 2012), es por eso que con el desarrollo y mejoramiento de la técnica de qPCR se han propuesto ecuaciones y metodologías para poder considerar esta variación que presentan los genes de referencia que consisten en la inclusión de más genes de carácter constitutivo para que en conjunto, se pueda utilizar un set de dos o más genes de referencia (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Hellemans *et al.*, 2007). A pesar del hecho de que las investigaciones de expresión génica en metazoarios y en humanos han dirigido sus protocolos hacia una perspectiva más holística en la estrategia empleada con los genes de referencia, las investigaciones con microalgas y cianobacterias aun siguen empleando un único gen de referencia para evaluar el nivel de expresión de los genes de los microorganismos fotosintetizadores (Jeamton *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013; Ismaiel y Piercey-Normore, 2020).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

- Se pudo reducir a valores indetectables la carga de bacterias heterotróficas de los cultivos de *Arthrospira maxima* por 7 días con los tratamientos de dosis alta, media y baja del coctel 2 de antibióticos (cefoxitina, penicilina G y ampicilina) y cuando es cultivada en tubos de 10 ml e irradiada con  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz blanca fluorescente.
- Debido a los efectos negativos de los antibióticos no se considera adecuado utilizarlos en *A. maxima* para evaluar el nivel de expresión de transcritos.
- Es posible modular la composición proximal de *Arthrospira maxima* cuando se cultiva con diferente composición espectral de la luz.
- Los cultivos expuestos a la luz roja incrementaron el crecimiento de *Arthrospira maxima* (0.51 divisiones día<sup>-1</sup>), mientras que el menor crecimiento fue evaluado en los cultivos expuestos a la luz azul (0.33 divisiones día<sup>-1</sup>).
- El mayor contenido de clorofila a fue en los cultivos mantenidos con luz azul (0.94  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), mientras que los menores valores se obtuvieron en los cultivos mantenidos con luz roja (0.188  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).
- La mayor cantidad de ficocianina se evaluó en los cultivos expuestos con luz roja (7.63  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y los menores valores con luz verde (5.41  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y luz blanca (5.81  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).
- La mayor producción de proteínas ( $64.27 \pm 2.44\%$ ) se obtuvo con la luz verde, la mayor producción de carbohidratos con la luz roja ( $44.29 \pm 4.98\%$ ) y la mayor producción de lípidos con la luz blanca ( $13.41 \pm 0.81\%$ ).
- El mayor valor de la máxima eficiencia cuántica (Fv/Fm) fue obtenido en el tratamiento con la luz azul (0.33).
- Cultivar *Arthrospira maxima* con luz de diferente composición espectral induce cambios en el metabolismo, lo cual conlleva a presentar cambios en el crecimiento, peso seco, fotosíntesis y composición proximal.

- Amplificar un grupo de siete genes de proteínas y enzimas específicas del metabolismo de *Arthrospira maxima* son una herramienta útil para evaluar los cambios moleculares inducidos por el efecto de la composición espectral de la luz.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

1. Se recomienda evaluar el efecto de la composición espectral de la luz en *Arthrospira maxima* cuando ésta es cultivada en la temperatura óptima de crecimiento (35 °C).
2. Se recomienda realizar un experimento donde se pueda cultivar *Arthrospira maxima* por un periodo aproximado de 7 días con luz roja, ya que fue la luz que fotoestimuló mejor el crecimiento y posteriormente irradiar el cultivo con luz roja o bien, una combinación de luz roja y luz azul para producir ficocianina.
3. Se recomienda continuar con la evaluación del nivel de expresión de los transcritos de los genes propuestos en el presente estudio dado que son una buena selección para evaluar las rutas metabólicas más importantes de *Arthrospira maxima* sin la necesidad de utilizar tecnologías de secuenciación masiva.
4. Normalizar el valor de cuantificación (Cq) entre el gen de referencia y los genes objetivo, puesto que una gran diferencia entre los Cq's del gen de referencia y los genes objetivo pueden causar un sesgo en la cuantificación de la expresión de los genes.
5. Se recomienda evaluar el perfil completo de transcritos (ARNm) mediante la técnica de RNA-Seq con tecnología de secuenciación masiva para elucidar los genes que son más promovidos y los genes que son más suprimidos cuando *Arthrospira maxima* es irradiada con diferentes composiciones espectrales de luz.

## Literatura citada

---

- Al-Saman, M., Doleib, N.M., Ibrahim, M.R., Nasr, M.Y. Tayel, A.A., Hamouda R.A. 2020. *In vitro* and *in vivo* hypolipidemic properties of the aqueous extract of *Spirulina platensis*, cultivated in colored flasks under artificial illumination. PeerJ. 8:e10366 <https://doi.org/10.7717/peerj.10366>
- Alano-Ragaza, J., Sakhawat-Hossain, Md., Meiler, K.A., Velasquez, S.F., Kumar, V. 2020. A review on Spirulina: alternative media for cultivation and nutritive value as an aquafeed. Reviews in Aquaculture. 1-25. <https://doi.org/10.1111/raq.12439>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215:403-410.
- Ananyev, G., Gates, C., Dismukes, G. C. 2018. The multiplicity of roles for (bi) carbonate in photosystem II operation in the hypercarbonate-requiring cyanobacterium *Arthrospira maxima*. Photosynthetica. 56(1): 217-228.
- Andersen, R.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Oxford. China pp. 589.
- Andrews, S., 2010. Babraham bioinformatics-FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. Consultado el 16 04 20 <https://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Apt. K.E., Collier, J.L., Grossman, A.R. 1995. Evolution of the phycobiliproteins. Journal of Molecular Biology. 248:79-96.
- Blight, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal Biochemistry and Physiology. 37:911–917.
- Bolger, A.M., Lohse, M., USadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Byung-Hyuk, K., Hee-Mock Oh, Young-ki, L., Gang-Guk, C., Chi-Yong, A., Byung-Dae Y., Hee-Sik, K. 2006. Simple method for RNA preparation from Cyanobacteria. Journal of Phycology. 42, 1137-1141.
- Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M.C., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E. 2015. The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture. Algal Research 11:63-73.
- Cardinali, G., Liti, G., Martina, A. 2000. Non-radioactive dot-blot DNA reassociation for unequivocal yeast identification. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50:931-6.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. Microbiological reviews. American Society of Microbiology. 47(4):551-578.

- Ciferri, O., Tiboni, O. 1985. The Biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Annual Reviews in Microbiology 39:503-526.
- Chapman, M.J., Margulis, L. 1998. Morphogenesis by symbiogenesis. International Microbiology. 1:319-326.
- Chen, H.B., Wu, J.Y., Wang, C.F., Fu, C.C., Shieh, C.J., Chen, C.I., Wang, C.Y., Liu, Y.C. 2010. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. Biochemical Engineering Journal. 53:52-56.
- Chiaverini, J. 1972. Techniques d'extraction et d'analyse des lipids. – Université de Paris. Station Zoologique, Villefranche-Sur-Mer. – Note de Travail. 12:1-12.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics Application Note. Oxford University Press. 21(18):3674-3676.
- da Fontoura, D., Radmann, E.M., Duarte, J.H., de Morais, M.G., Vieira-Costa, J.A. 2018. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. Bioresource Technology. 256: 38-43.
- da Fontoura, D., Hartwig, J.D., Guidetti-Vendruscolo, R., Wagner, R., Ballus, C.A., DaSilva-Oliveira, W., Teixeira-Godoy, H., Teixeira-Barcia, M., Greque-de Morais, M., Radmann, E.M., Vieira-Costa J.A. 2020. Role of light emitting diode (LED) wavelengths on increase of protein productivity and free amino acid profile of *Spirulina* sp. cultures. Bioresource Technology. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123184>
- da Silva-Carmo J., Lombardi, T. 2020. Chlorophylls in Microalgae: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis. En Jacob-Lopez, E. *et al.* (Eds). Pigments from Microalgae Handbook. Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_1)
- de Marsac, N.T., Mazel, D., Damerval, T., Guglielmi, G., Capuano, V., Houmard, J. 1988. Photoregulation of gene expression in the filamentous cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601: light-harvesting complexes and cell differentiation. Photosynthesis Research. 18:99-132.
- del Río-Portilla, M.A., Beaumont, A.R. 2008. Sperm concentration in the mussel *Mytilus edulis* L.: a spectrophotometric measurement protocol. Aquaculture International. 16:573-580.
- Depraeteres, O., Deschoenmaeker, F., Badri, H., Monsieurs, P., Foubert, I., Leys, N., Wattiez, R., Muylaert, K. 2015. Trade-Off between growth and carbohydrate accumulation in nutrient-limited *Arthrospira* sp. PCC 8005 studied by integrating transcriptomic and proteomic approaches. PLoS ONE. 10(7): e0132461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132461>

- Deshnium, P., Paithoonrangsarid, K., Suphatrakul, A., Meesapyodsuk, D., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S. 2000. Temperature independent and dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). FEMS Microbiology Letters 184, 207-213.
- DiNicolantonio, J.J., Bhat, A.G., OKeefe, J. 2020. Effects of *Spirulina* on weight loss and blood lipids: a review. Openheart. British Cardiovascular Society. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2018-001003>
- Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B.A., von Döhren, H., Börner, T. 2001. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. Microbiology 147 (11):3113-3119.
- Dubinsky, Z., Matzukawa, R., Karube, I. 1994. Photobiological aspects of algal mass culture. Journal of Marine Biotechnology. 2:61-65.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28:350–356.
- Eskins, K., Zhong-Jiang, C., Shibles, R. 1991. Light-quality and irradiance effects on pigments, light-harvesting proteins and Rubisco activity in a chlorophyll and light harvesting-deficient soybean mutant. Physiologia Plantarum. 83: 47-53.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, por sus siglas en inglés), 2015. La FAO y los 17 objetivos de desarrollo sostenible. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. I4997S/1/09.15. p. 8.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, por sus siglas en inglés), 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Farrar, W.V. 1966. Tecuitlatl: A glimpse of Aztec food technology. Nature. 211(5047):341-342.
- Fogg, G.E., Thake, B.J. 1987. Algal cultures and phytoplankton ecology. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.
- Fontoura-Prates, D., Radmann, E. M., Duarte, J. H., de Moraes, M. G., Costa, J. A. V. 2018. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. Bioresource Technology. 256, 38-43.
- Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., *et al.* 2010. Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. DNA Research. 17:85-103. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsq004> PMID: 20203057

- Garret, E., Min-Won, C. 1973. Kinetics and mechanisms of drug action on microorganisms XVII: Bactericidal effects of Penicillin, Kanamycin and Rifampin with and without organism pretreatment with bacteriostatic Chloramphenicol, Tetracycline and Novobiocin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 62(10):1666-1673.
- Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. En: R. Kolkowitz (Ed.), L. Radenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz. Akademische Verlag Leipzig. 14:916-931.
- Gene Ontology Consortium. 2004. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research* 32:D258-D261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh036>
- Golden, S.S. 1995. Light-responsive gene expression in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*. 177(7):1651. <https://doi.org/10.1128/jb.177.7.1651-1654.1995>
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Harcohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Palma, F., di, y W., B. 2013. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*. 29, 644-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Green, B.R. 2019. What happened to the Phycobilisome?. Review. *Biomolecules*. 9, 748 <https://doi.org/10.3390/biom9110748>
- Guedes, A.C., Katkam, N.G., Varela, J., Malcata F.X. 2014. Photobioreactors for cyanobacterial culturing. En: Sharma, N.K., Rai, A.K., Stal, L.J. (Eds.), *Cyanobacteria: an economic perspective*. John Wiley & Sons. 270-292. <https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch17>
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak K.J., Williams, P.M. 1996. Real Time Quantitive PCR. *Genome Methods*. 6:986-994.
- Hellemans, J., Mortier, G., Paepe, A.D., Sepelman, F., y Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*. 8, R19, <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Hess, J.L., Tolbert, N.E. 1967. Changes in Chlorophyll a/b ratio and products of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fixation by algae grown in blue or red light. *Plant Physiology*. 42:1123-1130.
- Holman, B.W.B., Malau-Aduli, A.E.O. 2012. *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01328.x>
- Holm, C., Meeks, W.D., Fangman, W.L., Bostein, D. 1986. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene* 42:169-73.
- Hongsthong, A., Deshnum, P., Paithoonrangsarid, K., Cheevadhanarak, S., Tanticharoen, M. 2003. Differential responses of three acyl-lipid desaturases to immediate temperature reduction occurring in two lipid membranes of *Spirulina platensis* strain C1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96:519-524.

- Hongsthong, A., Sirijuntarut, M., Yutthanasirikul, R., Senachak, J., Kurdrud, P., Cheevadhanarak, S., Tanticharoen, M. 2009. Subcellular proteomic characterization of the high-temperature stress response of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Proteome Science Bio Med Central* 7:33.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Zheng X., Yang J., Tomozumi, I., Stephens, R., Lempicki, R.A. 2009. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Current Protocols in Bioinformatics* <https://doi.org/10.1002/047120953.bi1311s27>
- 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.
- Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D., Adam, V. 2018. Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 148:108-118.
- Ibrahem, M.D., Ibrahim, M.A. 2013. The potential effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on tissue protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through estimation of P53 level. *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.03.009>
- Ihaka, R., Gentleman, R. 1999. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*. 5(3), 299-314.
- Ismail, M.M.S., El-Ayouti, Y.M., Piercey-Normore, M. 2016. Role oh pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Environmental microbiology*. 47(2) . 2016.01.003.
- Ismail, M.M.S., Piercey-Normore, M.D. 2020. Gene transcription and antioxidants production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* grown under temperature variation. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.14821>
- Jansen, P.J., Morin, N., Mergeay, M., Leroy, B., Wattiez, R., Vallaey, T. *et al.* 2010. Genome sequence of the edible cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. *Journal of Bacteriology*. 192:2465-6. <https://doi.org/10.1128/JB.00116-10> PMID:20233937
- Jacquet, S., Zhong, X., Parvathi A., Sirram, A. y Pradeep, A. 2013. First description of a cyanophage infecting the cyanobacterium *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). 2013. *Journal of Applied Phycology*. 25:195-203.
- Jeamton, W. Mungpakdee, S., Sirijuntarut, M., Promeenate, P., Cheevadhanarak, S., Tanticharoen, M., Hongsthong, A. 2008. A combined stress response analysis of *Spirulina platensis* in terms of globally differentially expressed proteins, and mRNA levels and stability of fatty acid biosynthesis genes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 281:121-131.
- Jinhui, Y., Deyuan, M., Shujie, Q., Yunpeng, L., Han, X., Fei, B., Yan, Z., Chang, H., Rina, W., Junrui, W., Shengbo, Y., Yuping, B., 2020. Effects of different probiotic combinations on the components and bioactivity of *Spirulina*. *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900699>

- Kaldalu, N., Mei, R., Lewis, K. 2004. Killing by Ampicilin and Ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(3):890-896.
- Kamath-Mukund, M., Rex, A., Thangarathinam, K., Mohandass, R. 2017. Detection of microcystin producing cyanobacteria in *Spirulina* dietary supplements using multiplex HRM quantitative PCR. *Journal of Applied Phycology*. 29:1279-1286. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1011-4>
- Kannaujiya V. K., Prashant, R.S., Deepak, K., Rajeshwar, P.S. 2020. Phycobiliproteins in Microalgae: Occurrence, Distribution and Biosynthesis. En: Jacob-Lopez, (Eds). *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_1)
- Katsuda, T., Lababpur, A., Shimahara, K., Katoh, S. 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*. 35(1):81-86.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., Divanach, P. 2012. Antibacterial activity in microalgal cultures. *Aquaculture Research*. 43:150-1527.
- Kumar, S., Cheng, J., Ali-Kubar, A., Guo, W., Song, Y., Liu, S., Chen, S., Tian, J. 2021. Orange light spectra filtered through transparent colored polyvinyl chloride sheet enhanced pigment and growth of *Arthrospira* cells. *Bioresource Technology*. 319:124179.
- Kumaresan, V., Nizam, F., Ravichandran, G., Viswanathan, K., Palanisamy, R., Bhatt, P., Valan-Arasu, M., Al-Dhabi, N., Mala, K., Arockiaraj, J. 2017. Transcriptome changes of blue-green algae, *Arthrospira* sp. in response to sulfate stress. *Algal Research*. 23:96-103.
- Kumaresan, V., Sannasimuthu, A., Valan-Arusu, M., Al-Dhabi, N.A., Arockiaraj, J. 2018. Molecular insight into the metabolic activities of a protein-rich microalga, *Arthrospira platensis* by *de novo* transcriptome analysis. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4229-1>
- Lara, C., Guerrero, M.G. 1997. Interaction between Carbon and Nitrogen metabolism. En: Ray, A.K. (Ed) *Cyanobacterial Nitrogen metabolism and environmental biotechnology*. New York. Springer-Verlag. P. 131-148.
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, Y., Chen, M. 2015. Novel chlorophylls and new directions in photosynthesis research. *Functional Plant Biology*. 42, 493-501.
- Lima, G.M., Teixeira P., Teixeira, C., Filócomo, D., Lage, C. 2018. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*. 31:157-166.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*. 25(4):402-408.

- Loo-Teo, C., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A.M., Idris, A. 2014. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource Technology*. 162:38-44.
- López-Figueroa, F.D. 2018. Curso de fotobiología y biotecnología de algas y cianobacterias: Aplicaciones Cosmocéuticas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California. 29 de Octubre al 2 de Noviembre.
- Lopes-Pinto, F., Thapper, A., Sontheim, W., Lindblad P. 2009. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Molecular Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-79>
- Los, D.A., Ray, M.K., Murata, N. 1997. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* 25(6),1167-1175.
- Los, D.A., Murata, N., 1999. Responses to cold shock in Cyanobacteria. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 1(2): 221-230.
- Lowry, O.H., Rosebrugh, H.J., Farr, A.L., Randall, J.L., 1951. Protein measurement with de Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Luimstra, V.M., Schuurmans, J.M., Hellingwerf, K.J., Matthijs, H.C.P., Huisman, J. 2020. Blue light induces major changes in the gene expression profile of the cyanobacterium *Synechosystis* sp. PCC 6803. *Physiologia Plantarum*. (0)0-0:1-17. <https://doi.org/10.1111/ppl.13086>
- Macías-Sancho, J., Poersch, L.H., Bauer, W., Romano, L.A., Wasielesky, W., Borges-Tesser, M. 2014. Fishmeal substitution with *Arthrospira (Spirulina platensis)* in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*. 426-427:120-125.
- Madhyastha, H.K., Vatsala, T.M. 2007. Pigment production in *Spirulina fussiformis* in different photophysical conditions. *Biomolecular Engineering*. 24 301-305.
- Madigan, M., Martinko J., Parker J. 2003. Brock. *Biología de los microorganismos*. 10ª Edición. Pearson-Prentice Hall. Madrid, España. pp. 1012.
- Malara, G., Charra, R. 1972. Dosage des glucosides particuliers de phytoplancton selon la méthode de Dubois. Universit de Paris. Station Zoologique de Villefranche-sur-Mer. Notes de travail, 6:1-12.
- Manali, K.M., Arunraj, R., Kumar, T., Ramya, M. 2017. Detection of microcystin producing cyanobacteria in *Spirulina* dietary supplements using multiplex HRM quantitative PCR. *Journal of Applied Phycology* 29:1279-1286.
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana T., Rashid, A.N., Liu, J., Lu, Y., Zeng X., Ling, X., Jing, K. 2018. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*. 255:293-301.

- Margulis, L. 1971. The Origin of Plant and Animal Cells: The serial symbiosis view of the origin of higher cells suggests that the customary division of living things into two kingdoms should be reconsidered. *The Scientific Research Honor Society*. 59(2):230-235.
- Marioni, J., Mason, C., Mane, S., Stephens, M., Gilad, Y. 2008. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.079558.108>
- Markou, G. 2014. Effect of various colors of Light-Emitting Diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. *Applied Biochemistry Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0727-3>
- Marriot, M.F.H., Blankenship, R.E., 2011. Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 62; 515-548.
- Matufi, F., Choopani, Ali. 2020. *Spirulina*, food of past, present and future. *Health Biotechnology and Biopharma*. 3(4):1-20.
- McClements, D.J. 2019. Future Foods: A manifesto for research priorities on structural design of foods. *Food & Function*. Royal Society of Chemistry. <https://10.1039/C9FO02076D>
- Mexia-Bernal, K.H. 2011. Efecto de la salinidad e irradiancia en el crecimiento, fotosíntesis y composición bioquímica de *Spirulina maxima* para su utilización en la acuicultura. Tesis de Licenciatura. Universidad de Occidente. Sinaloa, México. pp. 108.
- Molina-Cárdenas, C. A., Sánchez-Saavedra, M.P., Licea-Navarro, A. F. 2016. Decreasing of bacterial content in *Isochrysis galbana* cultures by using some antibiotics. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 51(1), 101-112.
- Murray, P.R., Niles, A.C. 1981. Detection of Bacteriuria: Manual screening test and early examination of agar plates. *Journal of Clinical Microbiology*. 13(1):85-88.
- Nakajima, M.m Kitade, Y., Iitsuka, O., Fukuda, S., Saga, N. 2000. Research note: rapid extraction of high-quality genomic DNA from *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Phycology Research*. 48:15-7.
- Nomsawai, P., Tandeay, de Marsac, N., Thomas, J.C., Tanticharoen, Morakot, Cheevadhanarak, S. 1999. Light regulation of phycobilisome structure and gene expression in *Spirulina platensis* C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). *Plant Cell Physiology*. 40(12):1194-1202.
- Nowicka-Krawczyk, P., Mühlsteinová, R., Hauer, T. 2019. Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). *Scientific Reports, Nature*. 9:694 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36831-0>
- Nwoba, E.G, Parlevliet, D.A., Liard, D.W. Alameh, K., Moheimani, N.R. 2019. Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency. *Algal Research*. 39: 101433.

- Olaizola, M., Duerr, E., 1990. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 2:97-104.
- Oliveira, M.A., Monterio, M.P., Robbs, P.G., Leite, S.G. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*. 7:261-275.
- Oliveros, J.C. 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Owczarzy, R., Tataurov, A.V., Wu, Y., Manthey, J.A., McQuisten, K.A., Almabrazi, H.G., Sailor, C.A. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research*, 36(suppl\_2), W163-W169.
- Pagels, F., Guedes, A.C., Amaro, H.M., Kijjoa, A., Vasconcelos, V. 2019. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 37:422-443.
- Pagels, F., Bonomi-Barufi, J., Vega, J., Abdala-Díaz, R., Vasconcelos, V., Catarina-Guedes, A., Figueroa, FL. 2020. Light quality triggers biochemical modulation of *Cyanobium* sp. photobiology as tool for biotechnological optimization. *Journal of Applied Phycology*. 32:2851-2861.
- Pagels, F., Lopes, G., Vasconcelos, V., Guedes, A.C. 2020. White and red LEDs as two-phase batch for cyanobacterial pigments production. *Bioresource Technology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123105>
- Pande, S.V., Parvin-Khan, R., Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*. 6:415-423.
- Panyakampol, J., Cheevadhanarak, S., Sutheeworapong, S., Chaijaruwanich, J., Senachak, J., Siangdung, W., Jeamton, W., Tanticharoen, M., Paithoonrangsiard, K. 2015. Physiological and transcriptional responses to high temperature in *Arthrospira (Spirulina) platensis* C1. *Plant Cell Physiology*. 56(3):481-496.
- Park, J., Dinh, T.B. 2019. Contrasting effects of monochromatic LED lighting on growth, pigments and photosynthesis in the commercially important cyanobacterium *Arthrospira maxima*. *Bioresource Technology*. 291:121846.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. pp. 173.
- Patelou, M., Infante C., Dardelle, F., Randewig, D., Kouri, E., Udvardi, M., Tsiplakou, E., Mantecón, L., Flementakis, E. 2020. Transcriptomic and metabolomic adaptation of *Nannochloropsis gaditana* grown under different light regimes. *Algal Research*. 45:101735.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in R-T qPCR. *Nucleic Acids Research*. 29: E45.

- Ping, Y., Jian-Rong, L., Pei-Lin, Cen. 2002. Cloning and sequencing of the phycocyanin gene from *Spirulina maxima* and its evolutionary analysis. *Journal of Applied Phycology*. 14:307-310.
- Pinto, F., Pacheco, C.C., Ferreira, D., Moradas-Ferreira, P., Tamagnini, P. 2012. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR Analyses in Cyanobacteria. *PLoS ONE* 7(4): e34983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034983>
- Prabakaran, G., Sampathkumar, P., Kavisri M., Moovendhan, M. 2020. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009>
- Radhakrishnan, S., Bhavan P.S., Seenivasan, C., Shanthi, R., Muralisankar, T. 2014. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 67:25-33.
- Rehim-Abdel, A.F.M.T. 2017. The economic study of producing *Spirulina* Algae in Egypt. *Scientific Journal for Economic & Commerce*. 47(3):663-690.
- Robinson, M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression. Analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics Application Note*. Oxford University Press. 26(1):139-140.
- Ruyters, G. 1984. Effects of blue light on enzymes. En: Senger, H. (eds) *Blue Light Effects in Biological Systems*. *Proceedings in Life Sciences*. Springer, Berlín, Heidelberg. 283-301. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-69767-8\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-642-69767-8_32)
- Sánchez-Saavedra, MP., Voltolina, D. 1994. The Chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under diferente light conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*: 107(1):39-44.
- Sánchez-Saavedra, MP., Saucedo-Carvajal, D., Castro-Ochoa, F., Molina-Cárdenas, C.A. 2020. The use of light spectra to improve the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* for biofuels production. *BioEnergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10070-1>
- Sang-Hyo, L., Ju, L., Yoori, K., Seung-Yop, L. 2016. The production of high purity phycocyanin by *Spirulina platensis* using light-emitting diodes based two-stage cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 178:382-395.
- Saranraj, P., Sivasakthi S. 2014. *Spirulina platensis* – food for future: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*. 4(1):26-33.
- Schacht, J. 1976. Biochemistry of neomycin ototoxicity. *Journal of the Acoustical Society of America*. 59(4):940-944.

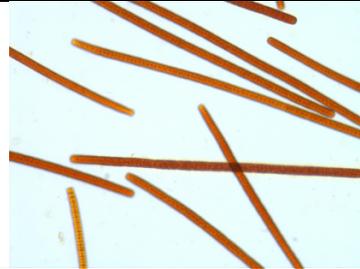
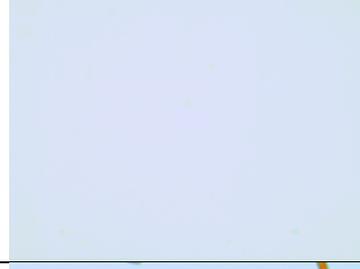
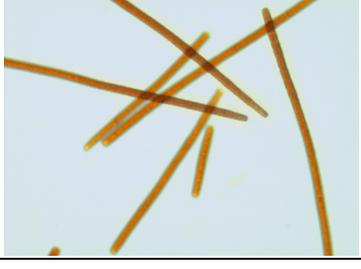
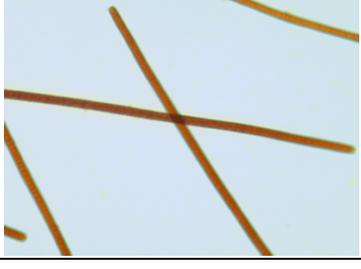
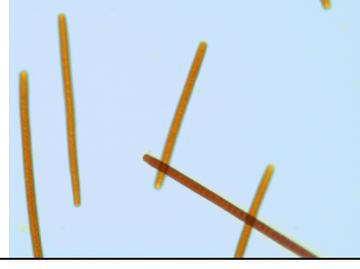
- Schulze, P.S., Barreira, L.A., Pereira, H.G., Perales, J.A., Varela, J.C. 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Cell Press Trends in Biotechnology*. 32(8):422-431.
- Sena, L., Rojas, D., Montiel, E., González, H., Moret, J., Naranjo, L. 2011. A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. *Cyanobacteria*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:1045-1053.
- Sharmila, D., Arumuganainar. S., Indhumathi, J., Kumaragur G., Natarajan. V., 2018. Impact of various color filtered LED lights on microalgae growth, pigments and lipid production. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 6(6):01-07.
- Simionato, D., Sforza, E., Corteggiani-Carpinelli, A., Bertucco, G.M., Giacometti, T., Morosinotto, T. 2011. Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: effects on lipids accumulation. *Bioresource Technology*. 173:284-290.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimbra, P.V. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*. 280:5-20.
- Spotts, C., Stanier, R. 1961. Mechanism of streptomycin action on bacteria: a unitary hypothesis. *Nature* 4803: 633-637.
- Su-Eon J, Sung, J.L., Youngnm, K., Cheon-Young, P., 2020. *Spirulina* powder as feed supplement to enhance abalone growth. *Aquaculture Reports*. 17:100318.
- Swarc, D., Swarc, K., Zielínski, M. 2020. Effect of light spectrum on the phycocyanin production by *Arthrospira platensis*. *Polish Journal of Natural Sciences*. 35(2): 209-218.
- Tan, L, Xu W, He, X, Wang, J. 2019. The feasibility of Fv/Fm on judging nutrient limitation of marine algae through indoor simulation and *in situ* experiment. *Estuar Coast Shelf Sci* 229:106411. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106411>
- Tapia-Gallardo, Y.D., 2019. Análisis Genómico y desempeño de cultivos axénicos de tres especies de microalga *Chaetoceros*. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 128 pp.
- Tardu, M., Dikbas UM., Baris, I., Kavakli, IH. 2016. RNA-seq analysis of the transcriptional response to blue and red light in the extremophilic red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Functional Integrative Genomics*. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0521-0>
- Tavanandi, H., Mittal R., Chandrasekhar, J., Raghavarao, K. 2018. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*. 31:239-251.
- Tedesco, M.A., Duerr, E.O. 1989. Light, temperature and Nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology* 1:201-209.

- Teimouri, M., Yeganeh, S., Rahimi-Mianji, G., Najafi, M., Mahjoub, S. 2019. The effect of *Spirulina platensis* meal on antioxidant gene expression, total antioxidant capacity, and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-0608-3>
- Tiboni, O., Di Pasquale, G., Ciferri, O. 1984a. Two *tuf* genes in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Bacteriology*. 159(1):407-409.
- Tiboni, O., Di Pasquale, G., Ciferri, O. 1984b. Cloning and expression of the genes for ribulose-1,5-biphosphate carboxylase from *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 783:259-264.
- Tiboni, O., Di Pasquale, G. 1987. Organization of genes for ribosomal proteins S7 and S12, elongation factors Ef-Tu and Ef-G in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 908:113-122.
- Tillet, D., Neilan, B.A. 2000. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology*. 36(1):251-258.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H.C.P., Ohno, T., Tanaka, A. 1999. Chlorophyll b and phycobillins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature* 8:159-162.
- Torres-Tiji, Y., Fields, F.J., Mayfield, S.P. 2020. Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances*. Elsevier. 40:107536. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>
- Turpin, P. J. F. 1827. *Spirulina oscillarioide*. En: Dictionnaire des sciences naturelles. De Levrault, Paris. 50:309-310.
- Öztürk, R.U., Tarhan, L. 2011. The relationship between the antioxidant system and phycocyanin production in *Spirulina maxima* with respect to nitrate concentration. *Turkish Journal of Botany*. 36:369-377. DOI:10.3906/bot-1106-1.
- Uslu, L.H., Isik, O., Sayin, S., Durmaz, Göksan, T., Gökpinar, S. 2009. The effect of temperature on protein and amino acid composition of *Spirulina platensis*. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. 2:139-142.
- Varma, A., Kwon-Chung, K. 1991. Rapid method to extract DNA from *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:810-2.
- Vonshak, A., Tomaselli, L. 2002 *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. En: Withon, B.A y Potts, M. (Eds). *The Ecology of Cyanobacteria*. ISBN: 978-0-7923-4735-4.
- Wahadoszamen, M., Krüger, T., Mane-Ara, A., Grondelle, R., Gwizdala, M. 2020. Charge transfer states in phycobilisomes. *Bioenergetics*. 1861-148-187. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2020.148187>
- Walter, A., de Carvalho, J.C., Soccol, V.T., Bisinella, A.B., Ghiggi, V., Soccol, C.R. 2011. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54(4): 675-682.

- Wang, H., Yang, Y., Chen, W., Ding, L., Li, P., Zhao, X., Wang, X., Li, A., Bao, Q. 2013. Identification of differentially expressed proteins of *Arthrospira (Spirulina) platensis*-YZ under salt-stress conditions by proteomics and qRT-PCR analysis. *Proteome Science*. 1-1:6.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 10(1):57-63 <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Watanuki, H., Ota, K., Tassaka, A., Kato, T., Sakai, M. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 258:157-163.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60:231-241.
- Wilkins, T.A., Smart, L.B. 1996. Isolation of RNA from plant tissue. En: *A laboratory guide to RNA: Isolation, Analysis and Synthesis*. Krieg, P.A. (Eds). Nueva York. Wiley-Liss. 21-41.
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímova, B., Wan, D., Kuca, K. 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives Toxicology*.
- Yao, S., Lyu, S., An, Y., Lu, J., Gjermansen, C., Schramm, A. 2018. Microalga-bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.14095>.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution à l'étude d' une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch at Gardner) Geitler. Université de Paris. France. Dissertation. [S.I.]: [s.n.].
- Zeinalov, Y., Maslenkova, L. 2000. On the action spectra of photosynthesis and spectral dependence of the quantum efficiency. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 26, 58-69.
- Zhao, B., Wanh, J., Gong, H., Wen, X., Ren, H., Lu, C. 2008. Effects of heat stress on PSII photochemistry on cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Science* 175: 556-564.
- ZoBell, C.E. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research*. 4:41-75.

## Anexos

**Tabla 7.** Registro fotográfico del efecto de las diferentes dosis del ensayo de axenización empleando el primer coctel de antibióticos.

Tratamiento	Réplica - 1	Réplica - 2	Réplica - 3
Control			
Dosis Alta			
Dosis Media			
Dosis Baja			

**Tabla 8.** Composición de medio de cultivo para *Spirulina platensis* (Aiba and Ogawa 1977, Schlösser 1994) Andersen, 2005.

Componente (g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Solución Stock	Cantidad usada	Concentración en el medio final (M)
Solución I	500 ml	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	13.61 g	1.62 x 10 <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	04.03 g	3.80 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	00.50 g	2.87 x 10 <sup>-3</sup>
Solución II	500 ml	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	2.50 g	2.94 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	1.00 g	5.74 x 10 <sup>-3</sup>
NaCl	-	1.00 g	1.71 x 10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	-	0.20 g	8.11 x 10 <sup>-4</sup>
CaCl * 2H <sub>2</sub> O	-	0.04 g	2.72 x 10 <sup>-4</sup>
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	-	0.01 g	3.60 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O	-	0.08 g	2.15 x 10 <sup>-4</sup>
Sol. de metales traza	(ver receta contigua)	1.0 ml	-
Sol. de vitaminas	(ver receta contigua)	1.0 ml	-

**Tabla 9. Solución de metales traza**

Componente	I° Solución Stock (g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad usada en el medio (M)	Concentración final
Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O	-	0.8 g	2.15 x 10 <sup>-6</sup>
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	-	0.7 g	2.52 x 10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	01.0	1 mL	3.48 x 10 <sup>-9</sup>
MnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	02.0	1 mL	8.97 x 10 <sup>-9</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.0	1 mL	1.62 x 10 <sup>-7</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	01.0	1 mL	3.44 x 10 <sup>-9</sup>
NaMoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	01.0	1 mL	4.13 x 10 <sup>-9</sup>
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.005	1 mL	2.00 x 10 <sup>-11</sup>

**Tabla 10. Solución de vitaminas**

Componente	I° Solución Stock (g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad usada	Concentración en el medio final (M)
Cianocobalamina (vitamina B <sub>12</sub> )	-	5 mg	3.69 x 10 <sup>-9</sup>