



EFFECTO DEL ESTRÉS PRODUCIDO POR LA VARIACIÓN DEL COLOR DE LUZ Y LA DEFICIENCIA DE NITRÓGENO, SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES Y PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA EN *Haematococcus pluvialis*

Presentado por:

Kimberly Rossan Ávila

Erika Dayan Rico

Carlos Andrés Rivero

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de:
Bacteriólogo y laboratorista clínico

Asesora

Myriam Judith Huérfano Torres Msc

Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

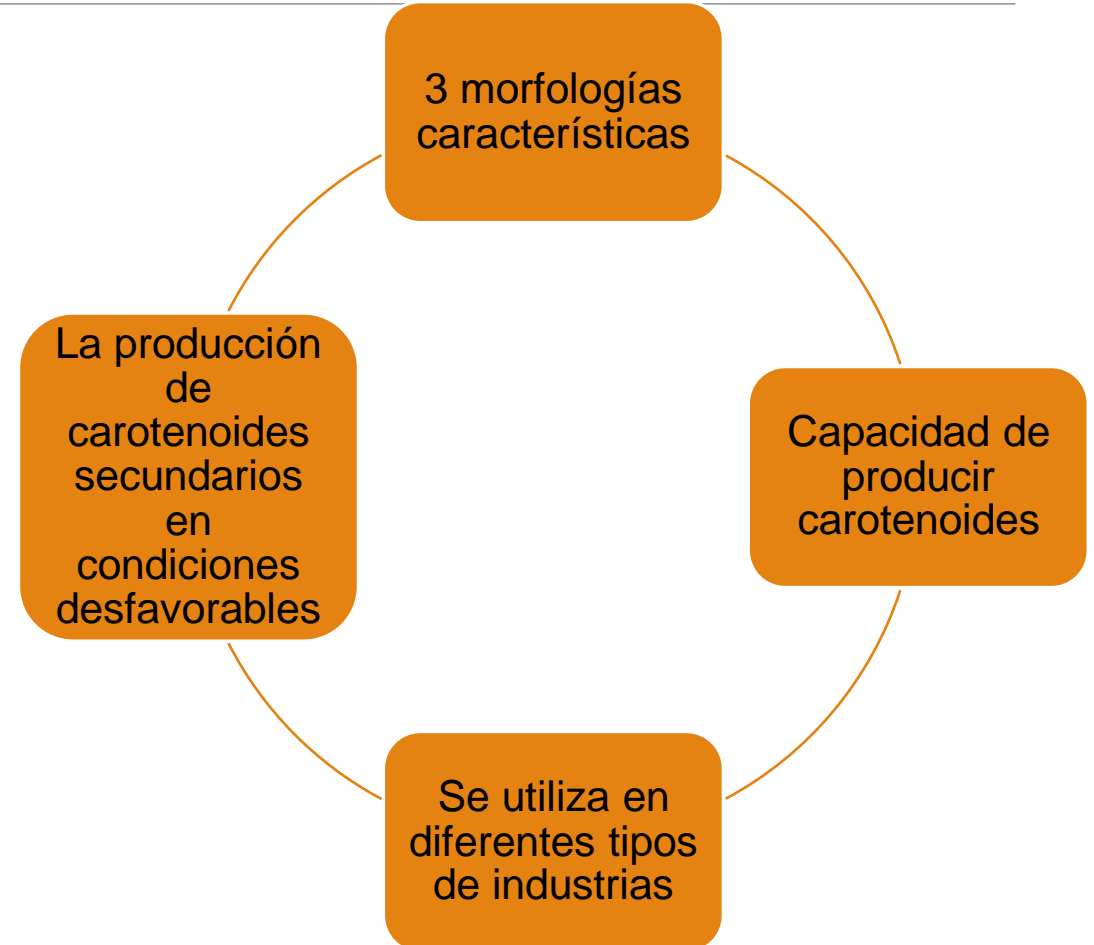


**Universidad
de La Sabana**



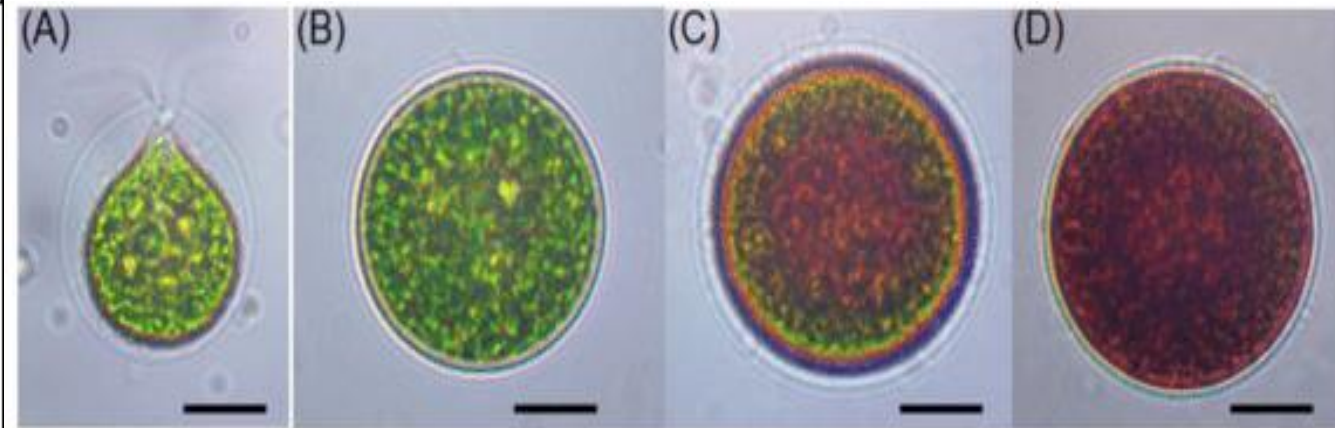
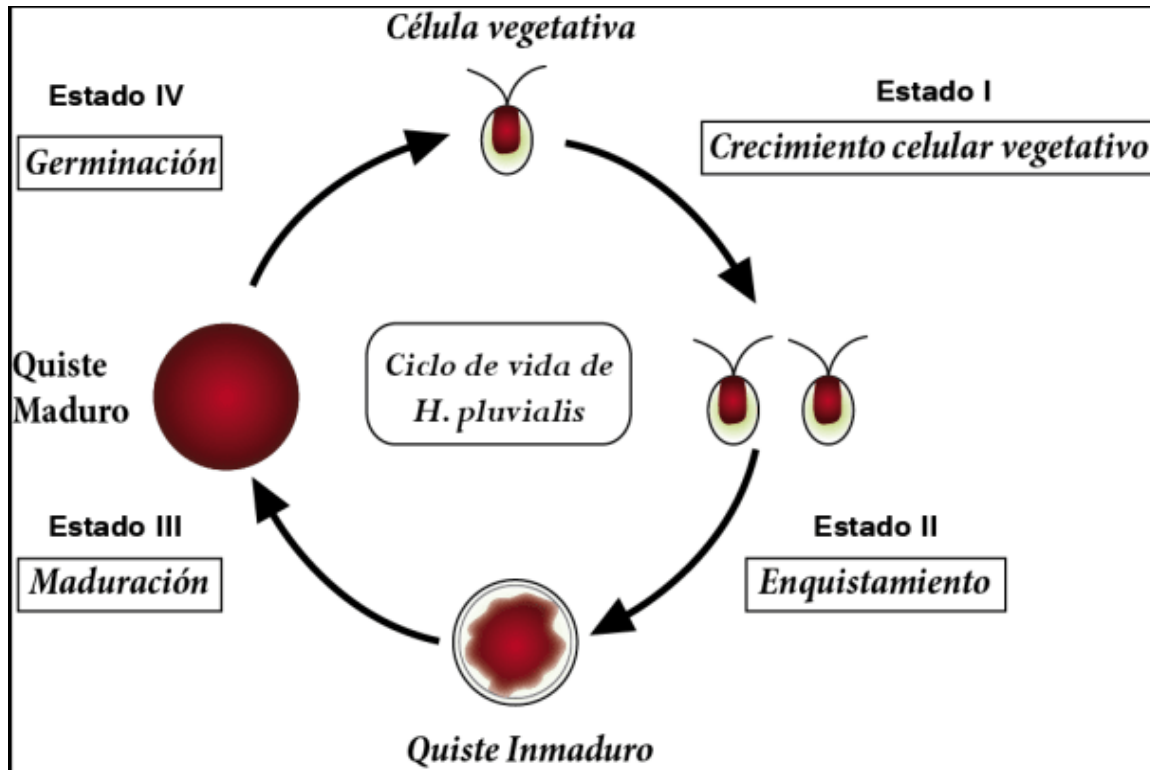
INTRODUCCIÓN

REINO	<i>Viridiplantae</i>
PHYLLIUM	<i>Chlorophyta</i>
CLASE	<i>Chlorophyceae</i>
ORDEN	<i>Volvocales</i>
FAMILIA	<i>Haematococcaceae</i>
GÉNERO	<i>Haematococcus</i>
ESPECIE	<i>pluvialis</i>





Ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis*



Tomado de: <http://www.astaxanthin.pe/wp-content/uploads/2018/04/Haematococcus-635x400-min.png>

https://www.researchgate.net/profile/Mahfuzur_Shah/publication/301694227/figure/fig1/AS:613975435792390@1523394559061/Light-microscopic-images-of-H-pluvialis-cells-in-life-cycle-A-Green-vegetative.png



Usos de la astaxantina

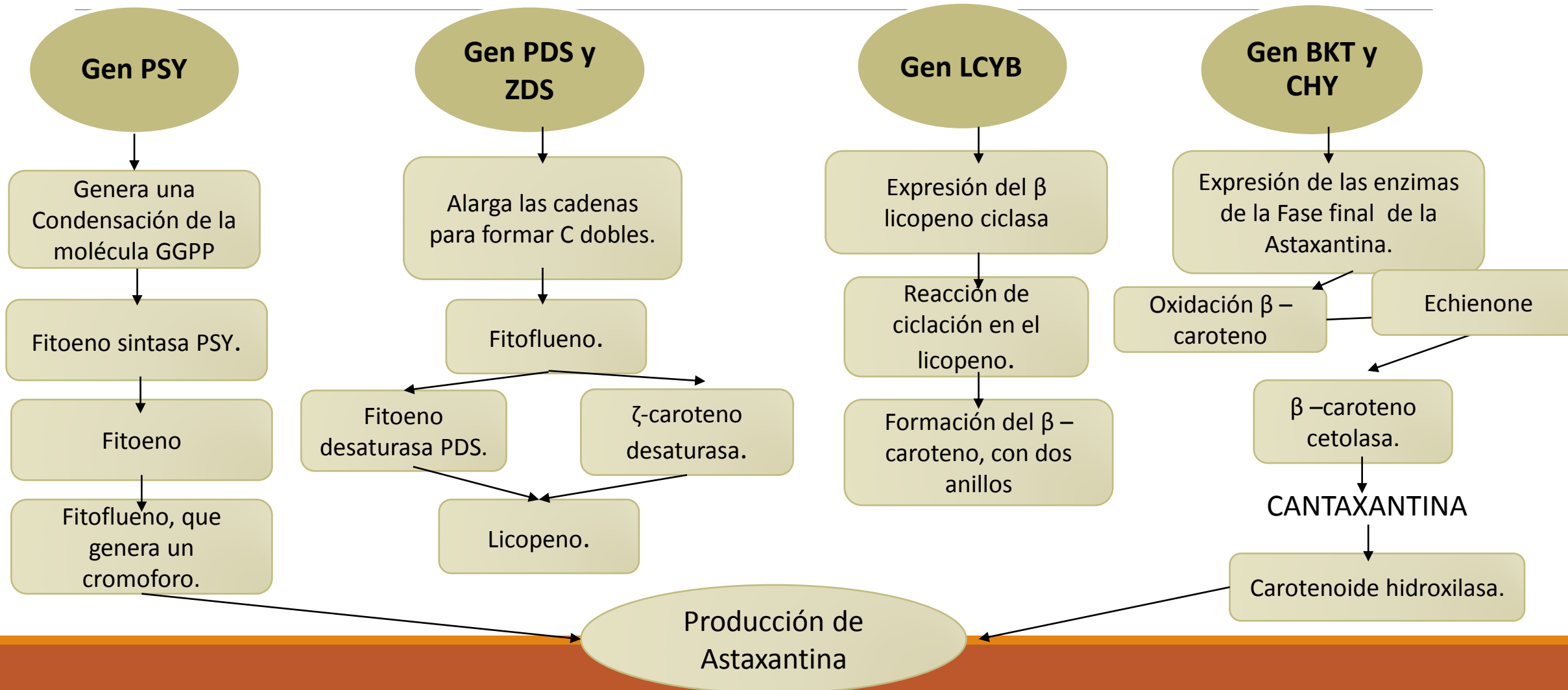
SECTOR	APLICACION	FUNCION	FUENTE
Acuicultura	Salmon y Trucha	Pigmentación	(Dominguez et.al.,2005; Lawlor & O'Brien, 1995; Lorenz & Cysewski, 2000)
		Etapas de crecimiento	
	Peces Marinos -Besugo	Pigmentación	
	Peces Ornamentales	Pigmentación	
	Cultivos de Camarón	Pigmentación	
Ornitología	Gallinas	Color de yema de los huevos	(Inboorr, 1998)
	Pollos	Pigmentación	
Farmacéutica	Radicales libres	Antioxidante	(Barros et.al.,2001; Guerin et al., 2008; Mortensen et al., 1997; Naguib, 2000; Pashkow et al; 2008)
	Peroxidación	Antioxidante	
	Salud Humana	Anti-cancerígeno	
	Piel, ADN y Retinas	Foto-protector	

Figura_3 Principales aplicaciones de la Astaxantina.

Fuente: Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. (Ing. Químico), Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2013: 73-82 [Z](#)

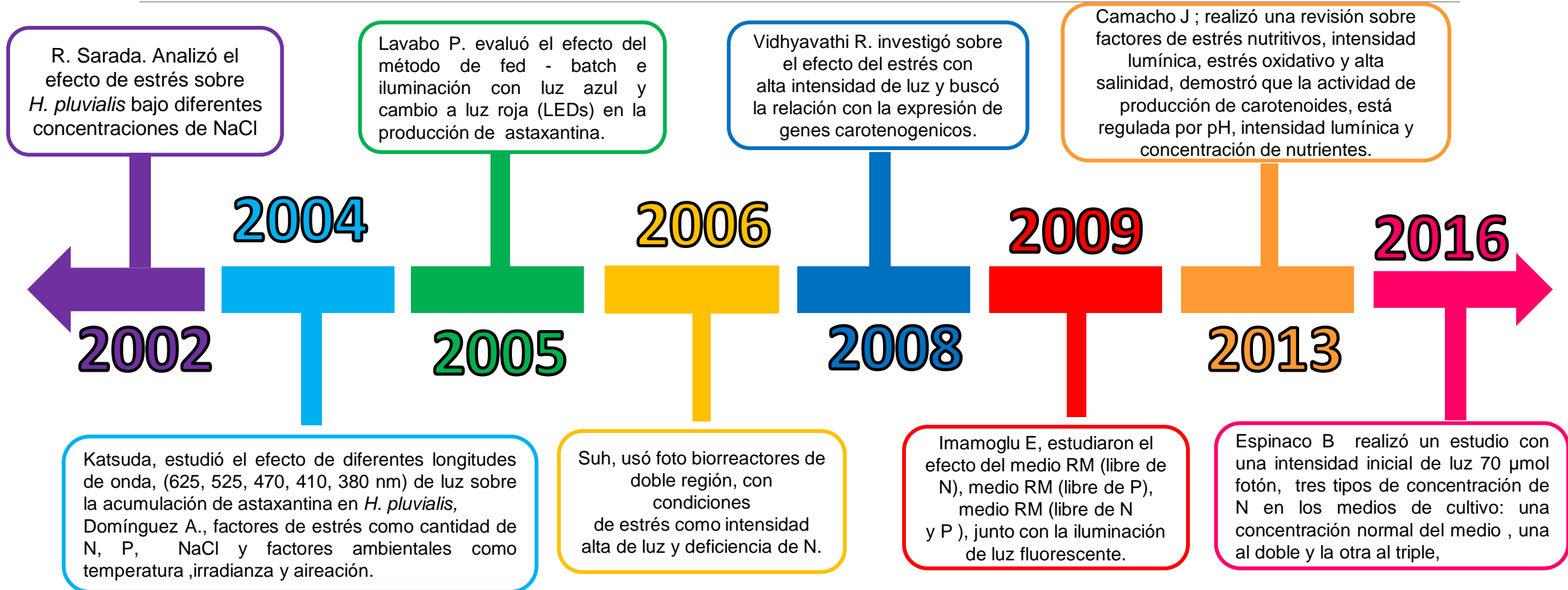


Genes que intervienen en la ruta metabólica para la producción de astaxantina en *H. pluvialis*





ANTECEDENTES





Pregunta problema

¿La variación del color de luz y la concentración de Nitrógeno al 4.0% como factores de estrés, pueden aumentar la producción de astaxantina y la expresión de genes de la ruta biosintética de la misma en *Haematococcus pluvialis*?



Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés producido por la variación en el color de luz y la concentración de Nitrógeno al 4.0% sobre la expresión de genes y la producción de astaxantina en *H. pluvialis*

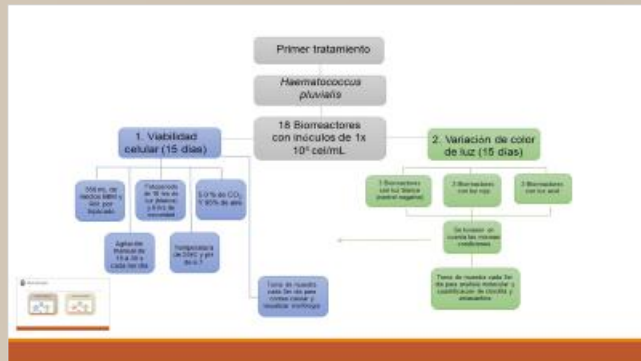
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la relación entre el efecto del estrés producido por la variación de color de luz y la concentración final de astaxantina en *H. pluvialis*.
- Establecer la relación entre el efecto del estrés producido por la variación de color de luz y la concentración de Nitrógeno al 4.0% , en la concentración final de astaxantina en *H. pluvialis*.
- Establecer el efecto de estrés producido por el cambio del color de luz y la concentración de Nitrógeno al 4.0% sobre la expresión de los genes de la ruta metabólica de la astaxantina.

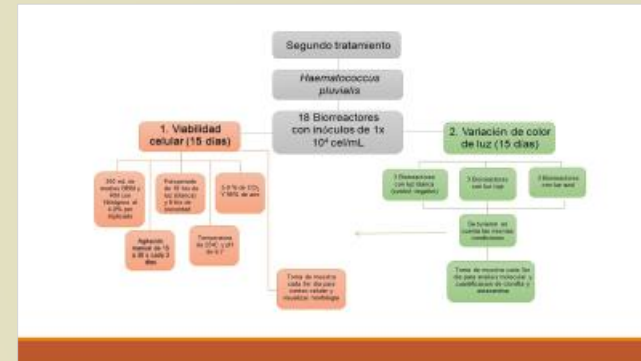


Metodología

PRIMER TRATAMIENTO

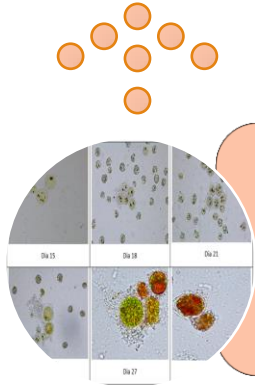


SEGUNDO TRATAMIENTO

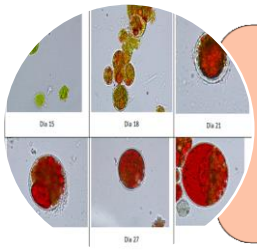




Resultados



Primer tratamiento: Variación de color de luz, como factor de estrés aplicado para la producción de astaxantina

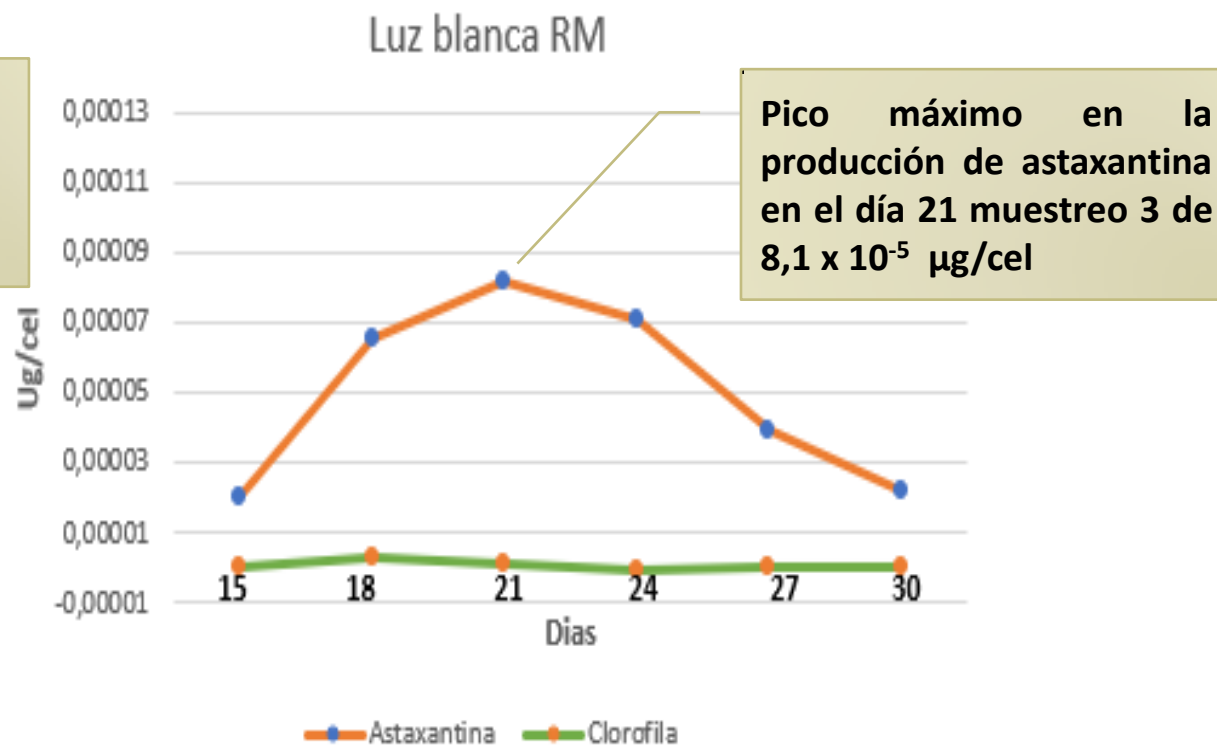
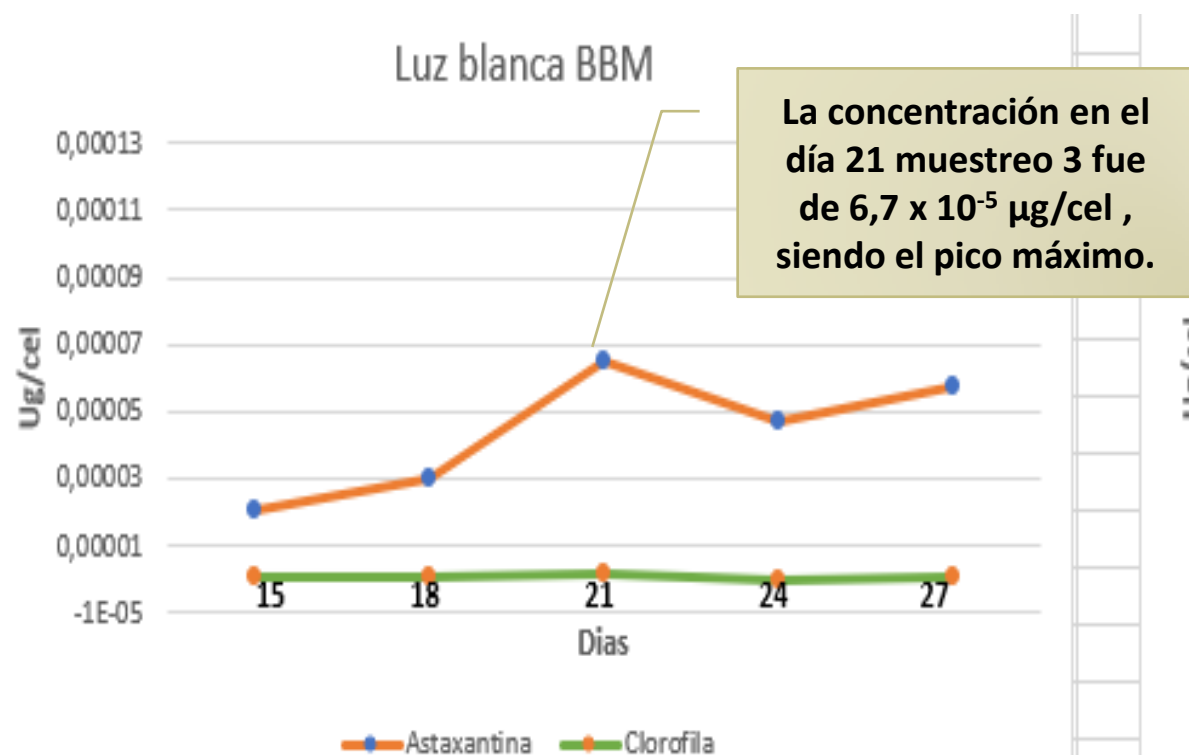


Segundo tratamiento: Variación de color de luz y concentración de Nitrógeno 4.0%, como factores de estrés

PRIMER TRATAMIENTO EXPERIMENTAL

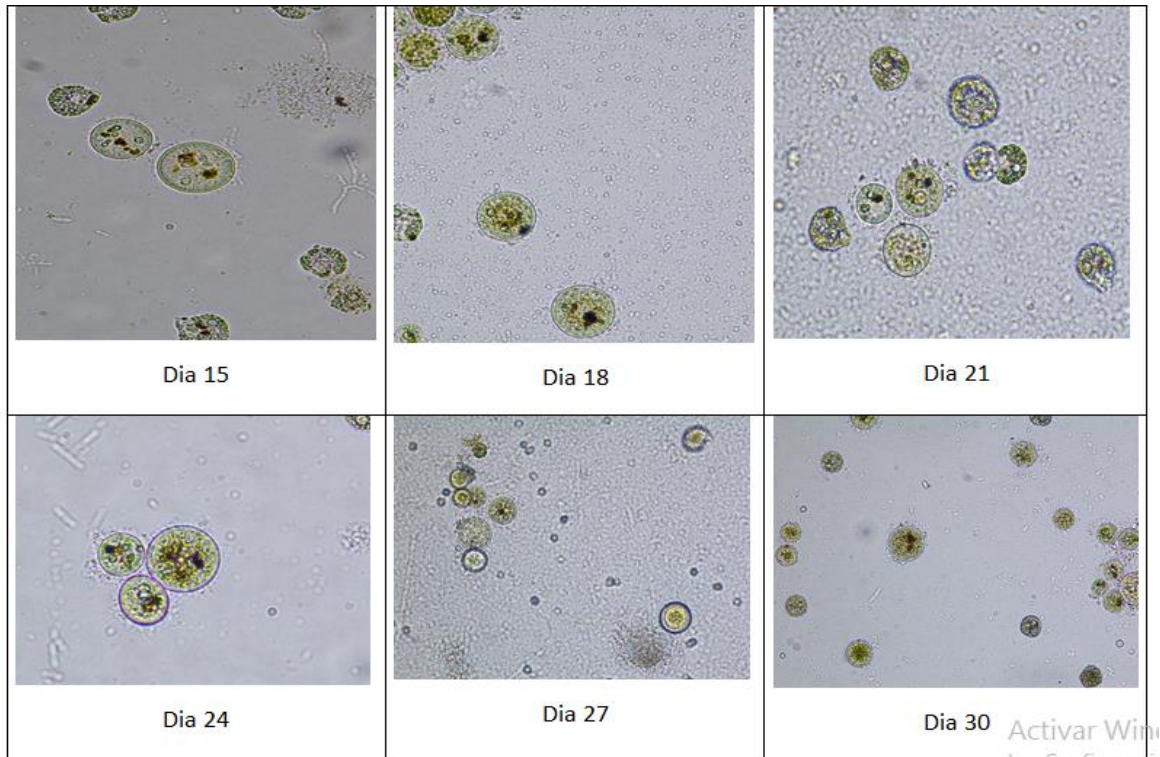


Graficas de producción de Clorofila y Astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con Luz Blanca (control).



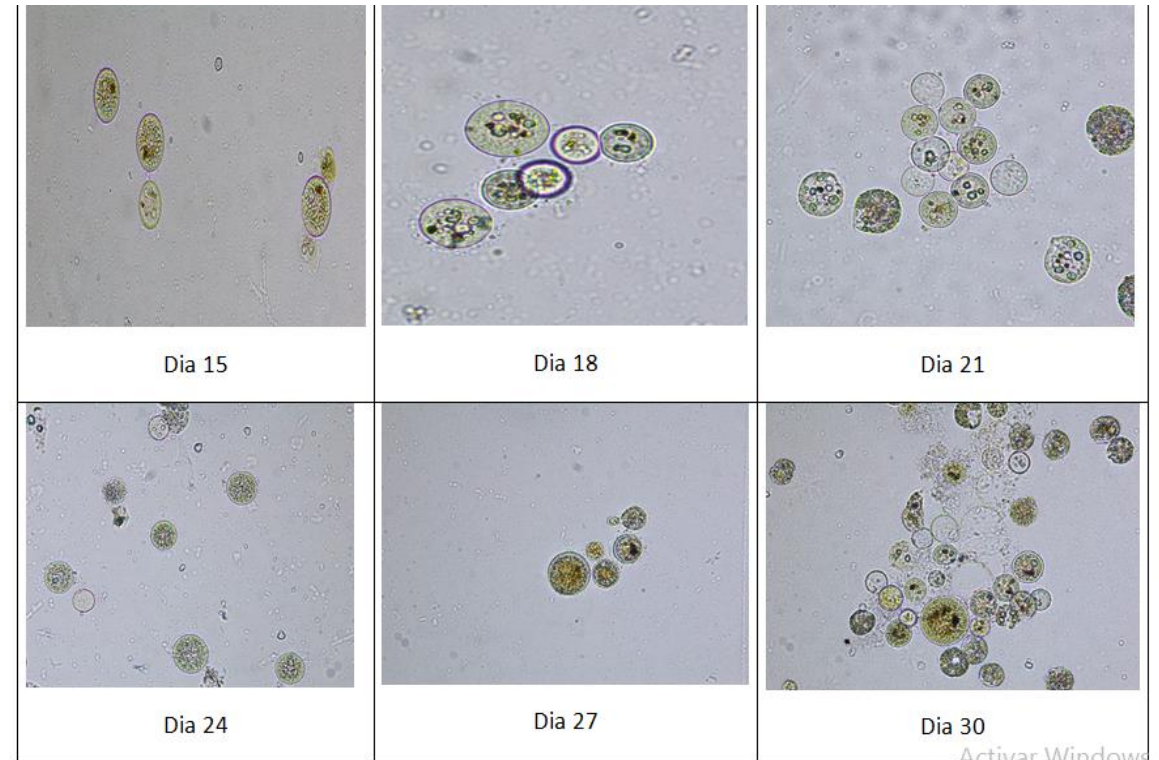
Fuente: Autores del proyecto

Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio BBM.



Fuente: Autores del proyecto

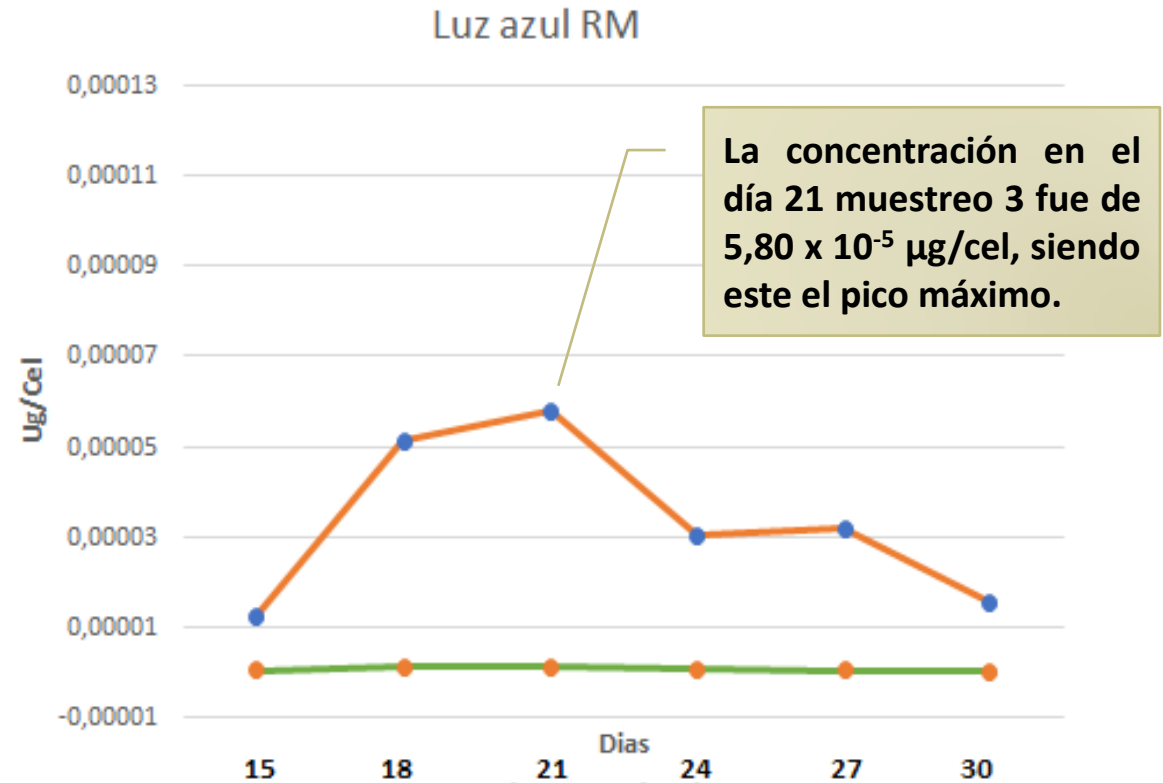
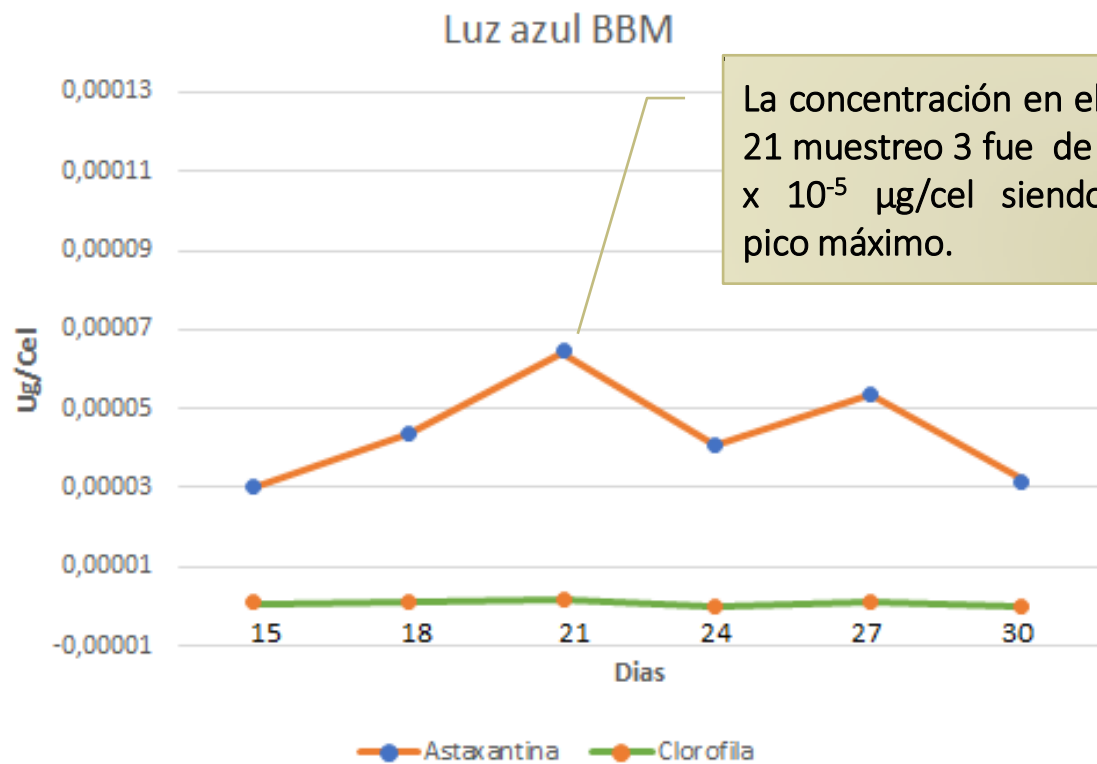
Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio RM



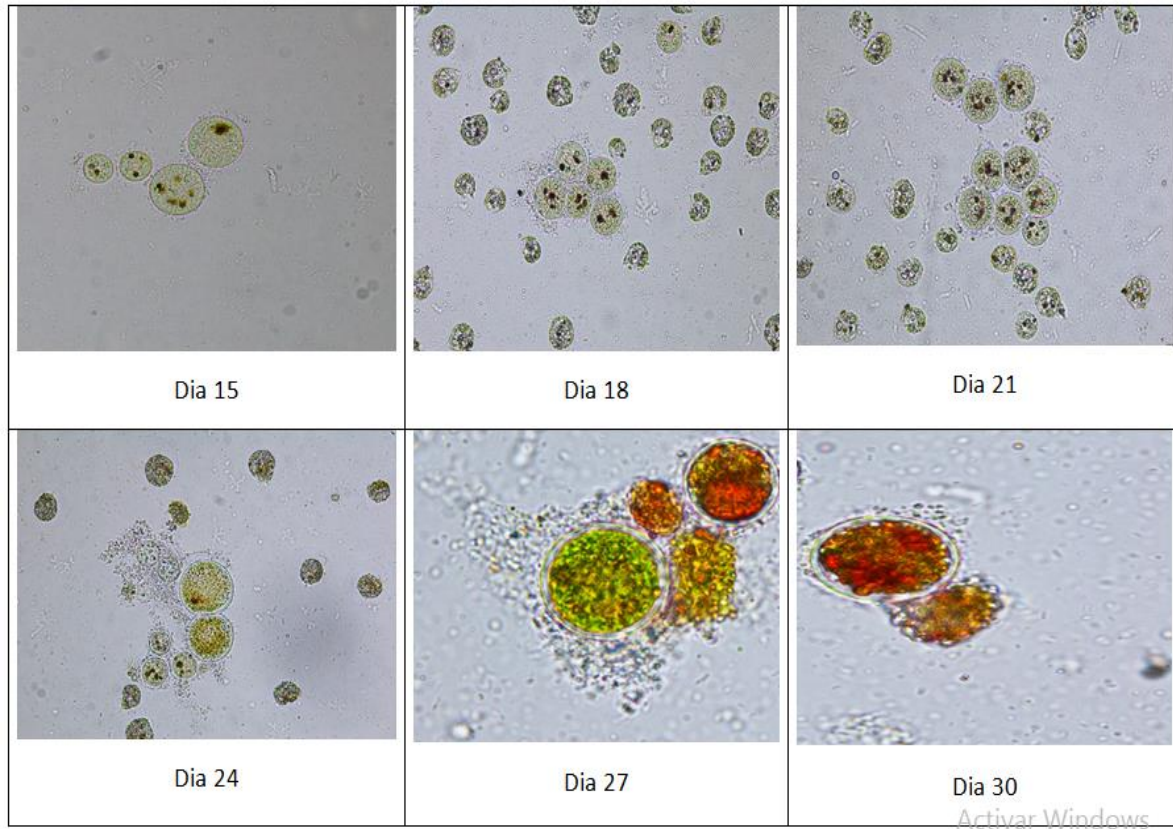
Fuente: Autores del proyecto



Grafica de producción de Clorofila y Astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel.}$ medio RM y BBM con Luz Azul (factor de estrés)

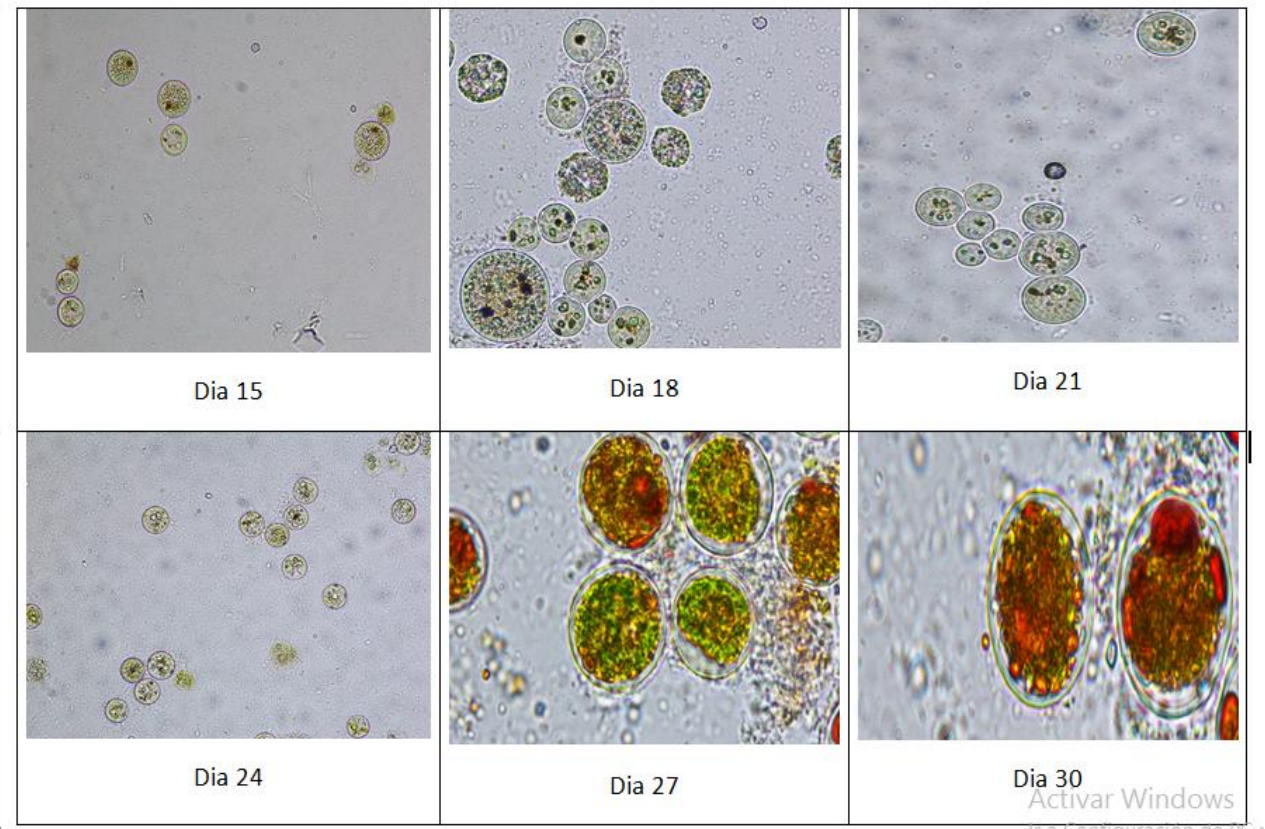


Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio BBM.



Fuente: Autores del proyecto

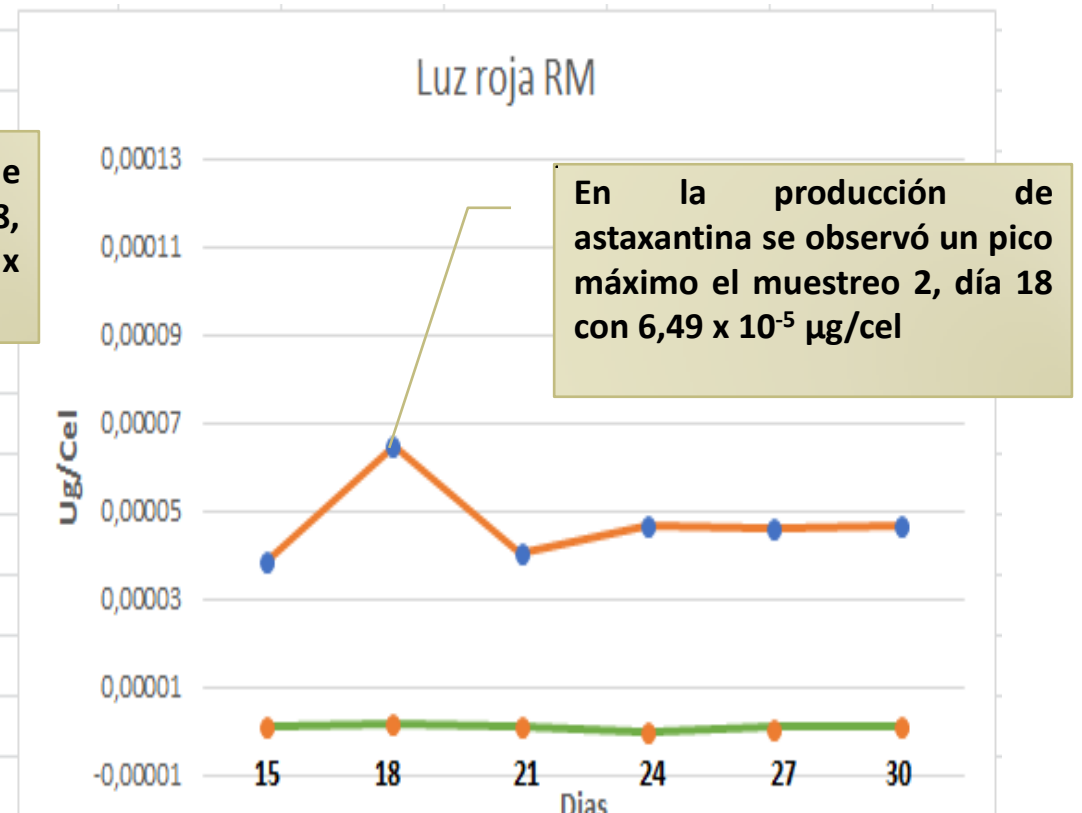
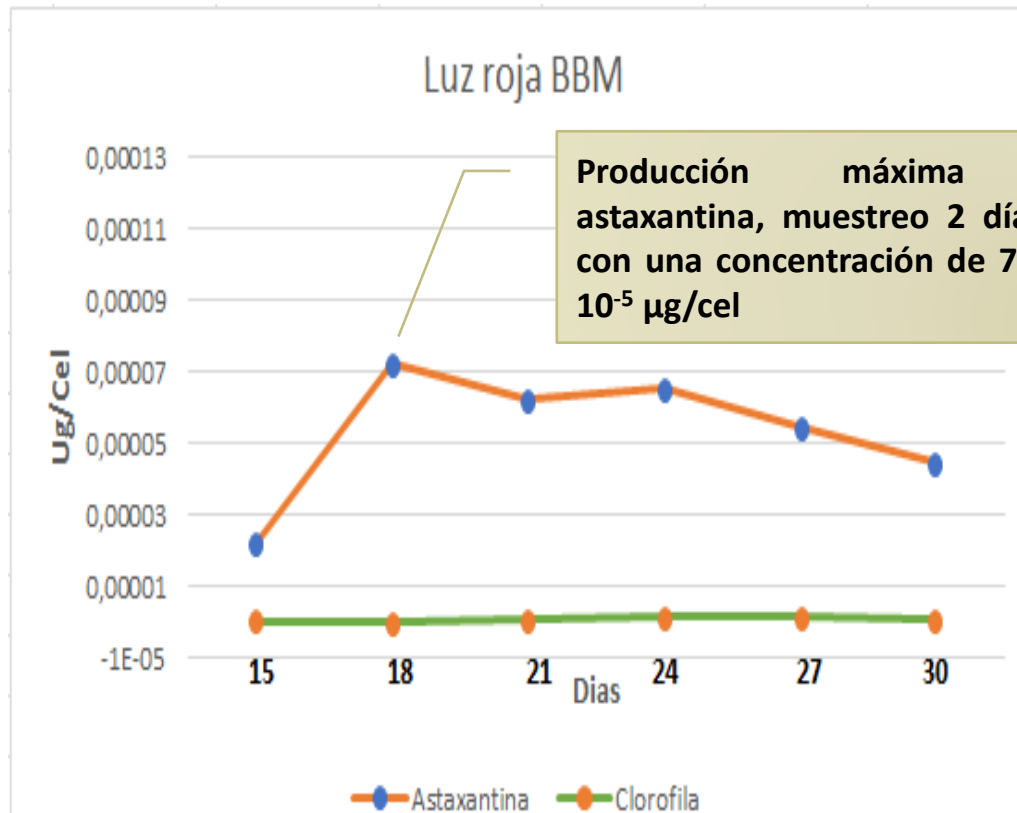
Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio RM.



Fuente: Autores del proyecto

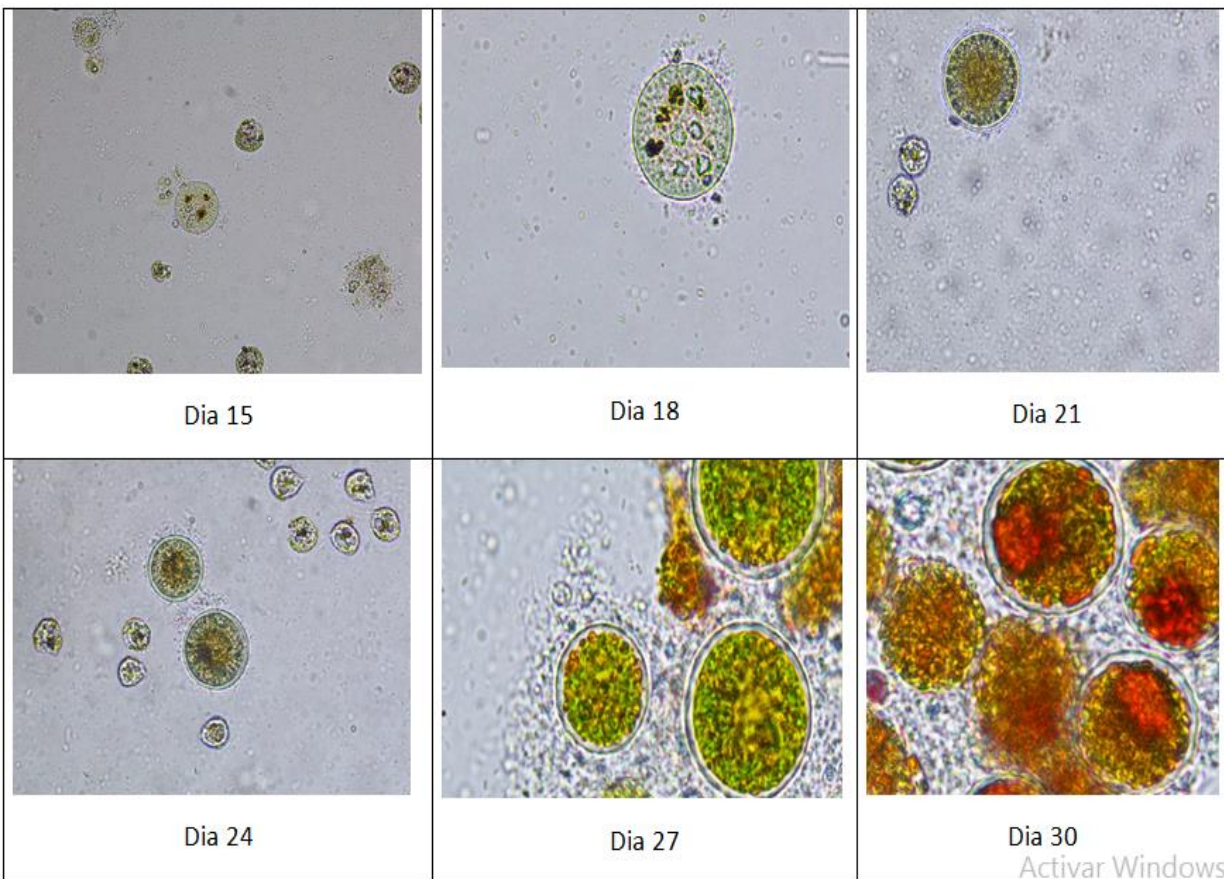


Graficas de producción de Clorofila y Astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ medio RM y BBM con luz Roja (factor de estrés)



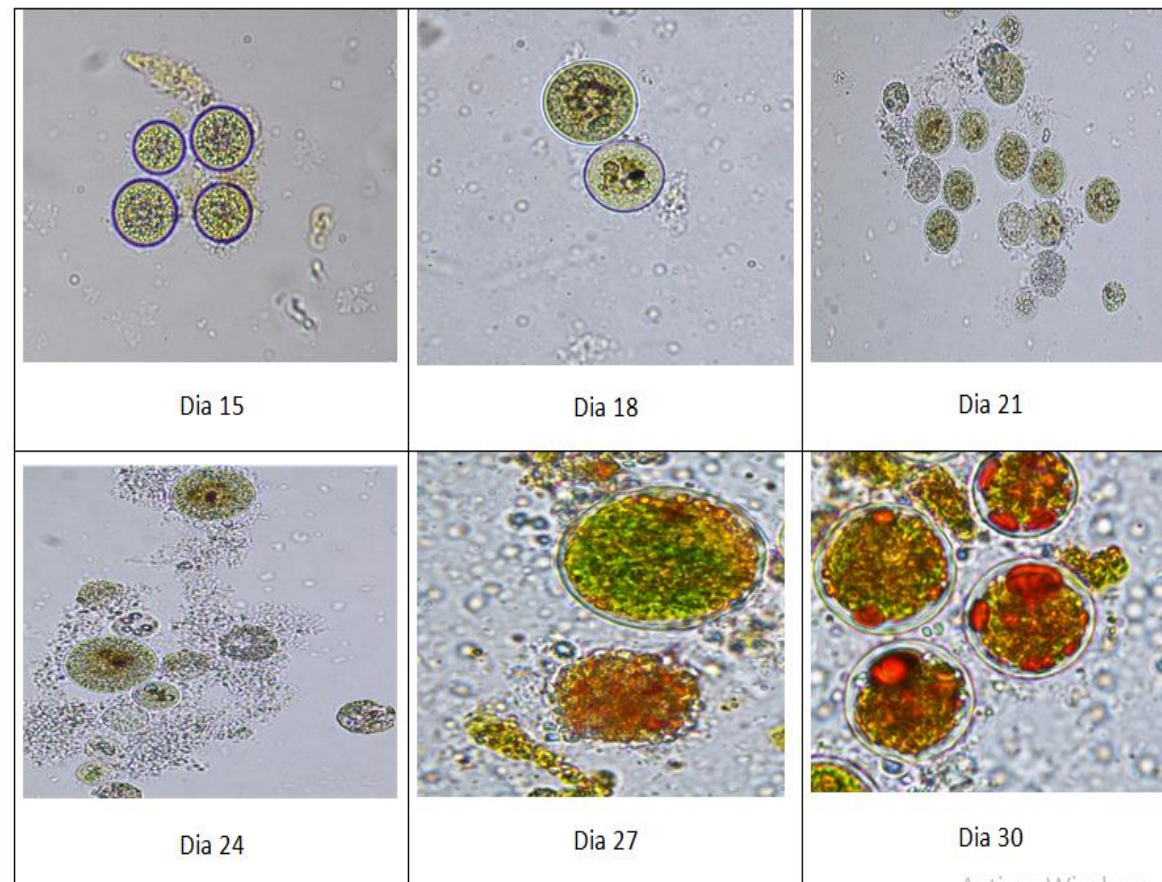
Fuente: Autores del proyecto

Registro fotográfico morfología celular tratamiento con luz roja medio BBM.



Fuente: Autores del proyecto

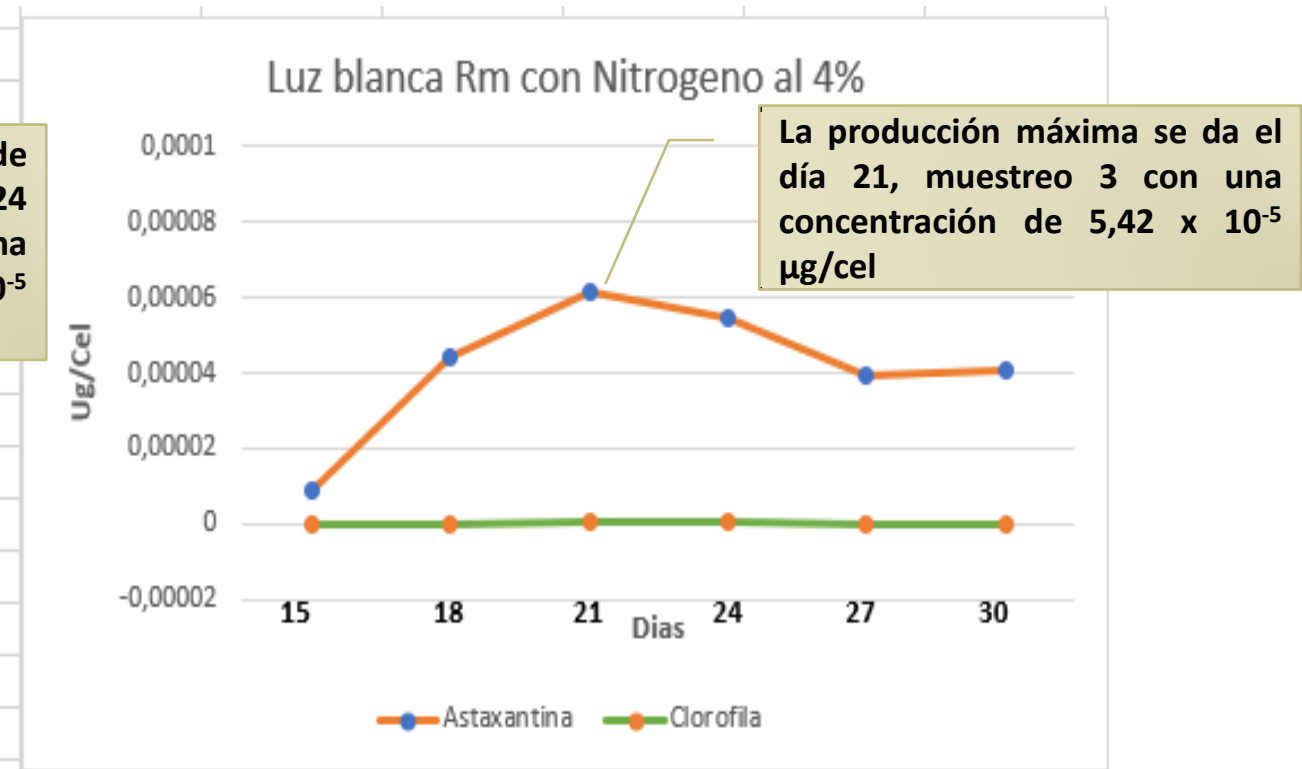
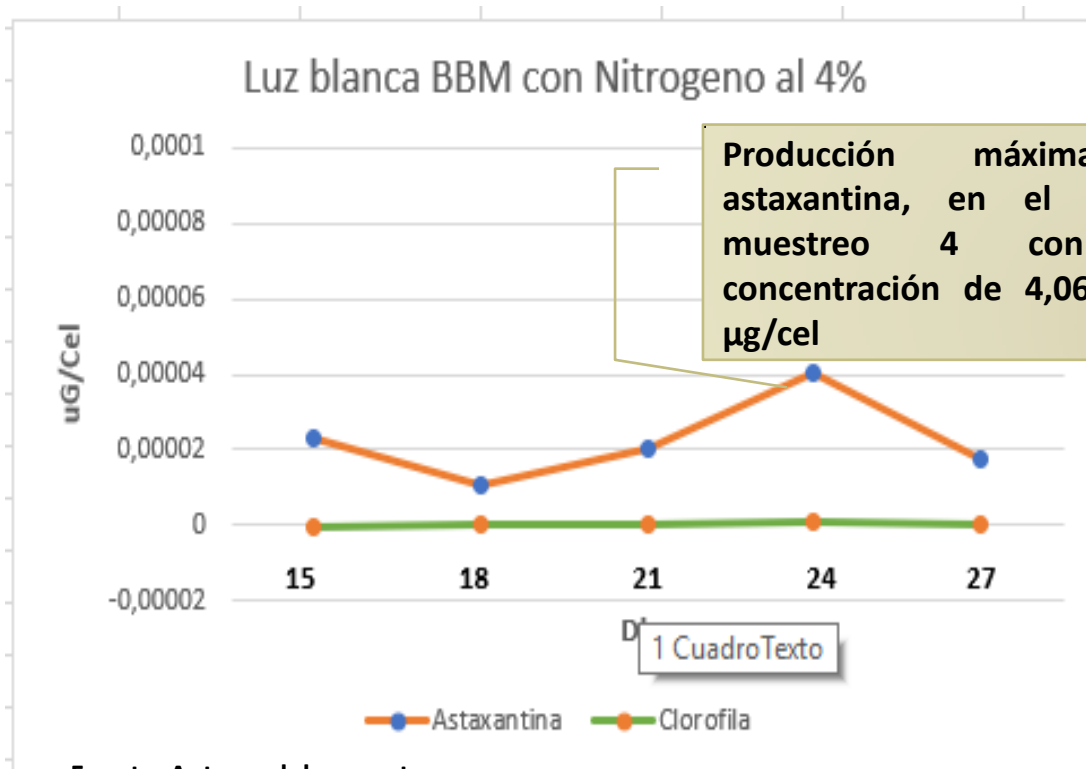
Registro fotográfico morfología celular tratamiento con luz roja medio RM.



Fuente: Autores del proyecto

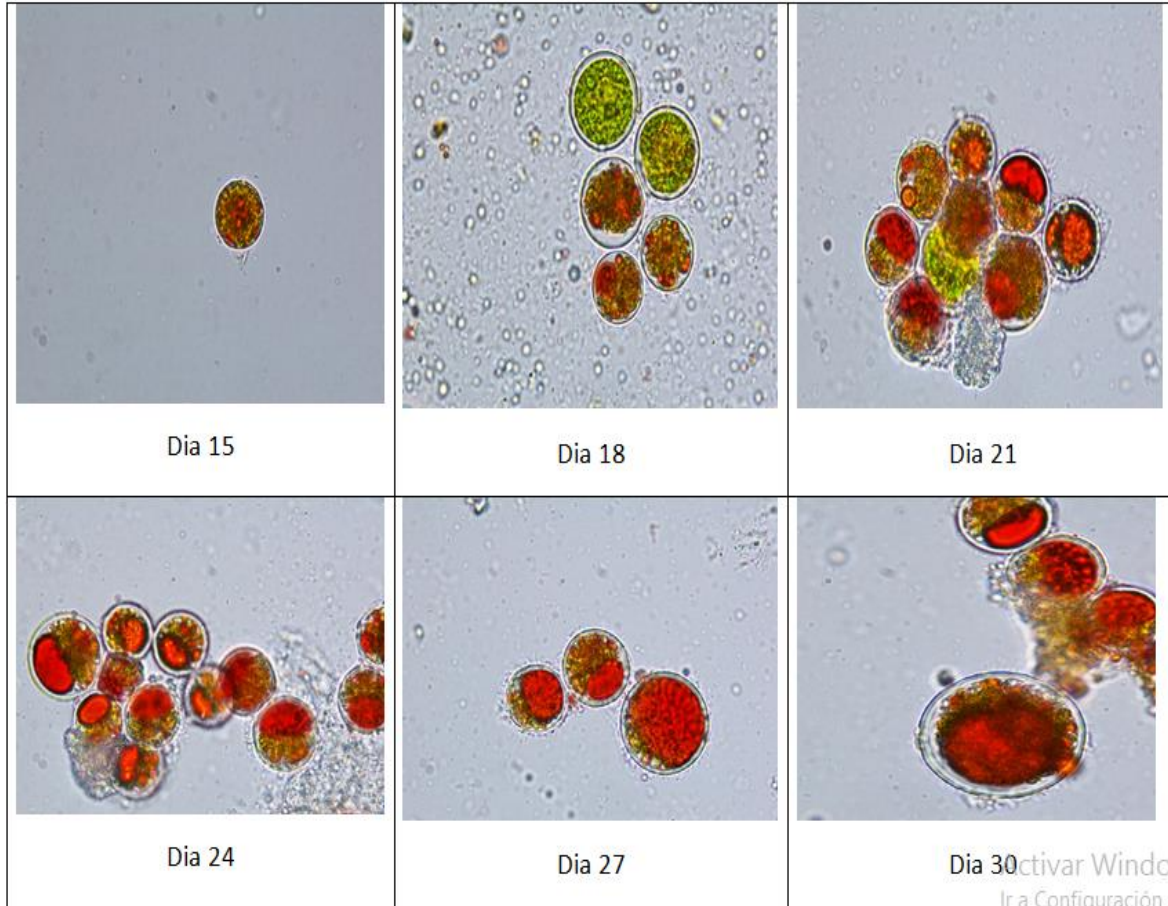
SEGUNDO TRATAMIENTO EXPERIMENTAL

Producción de Clorofila y Astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel} \times \text{mL}$ con concentración de Nitrógeno al 4.0% y luz blanca (control).



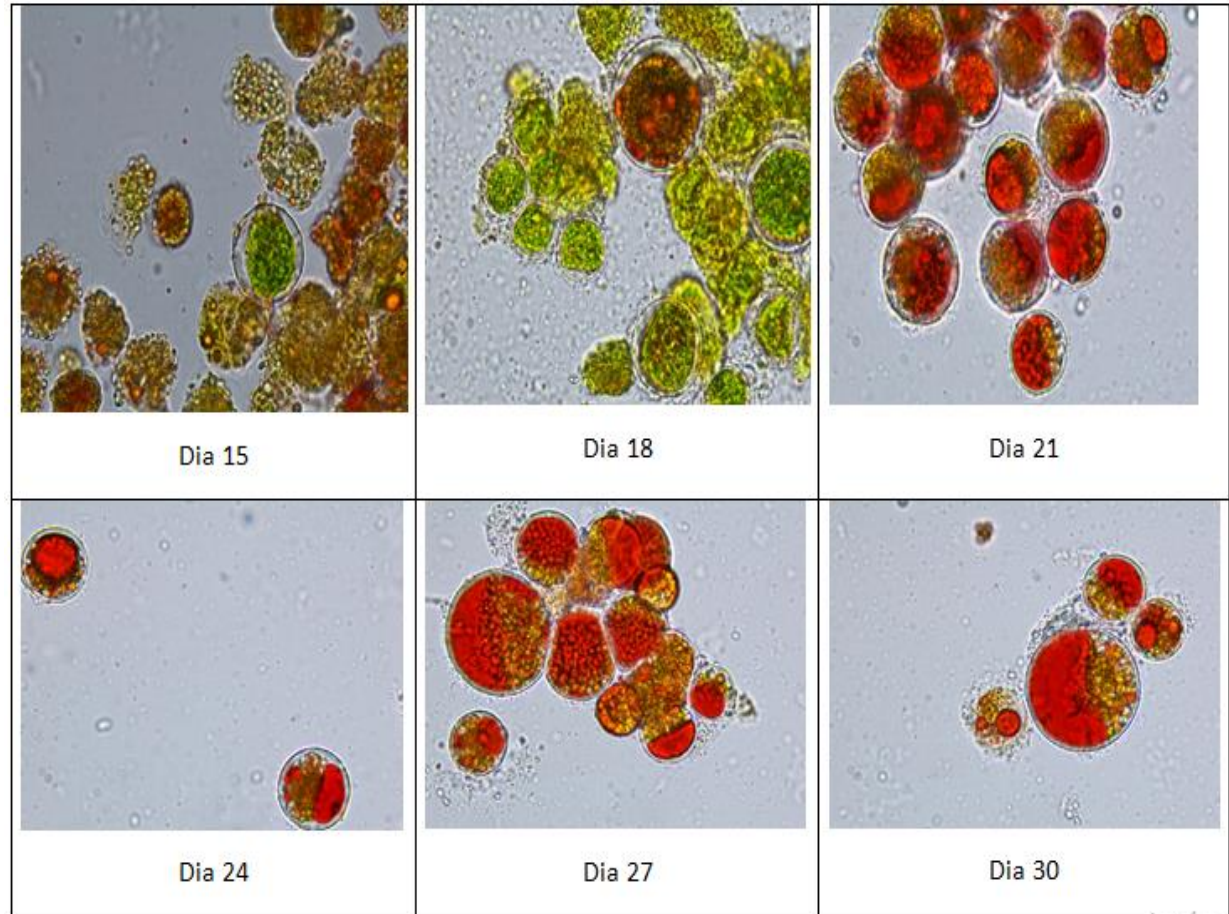
Fuente: Autores del proyecto

Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio BBM con nitrógeno al 4.0%



Fuente: Autores del proyecto

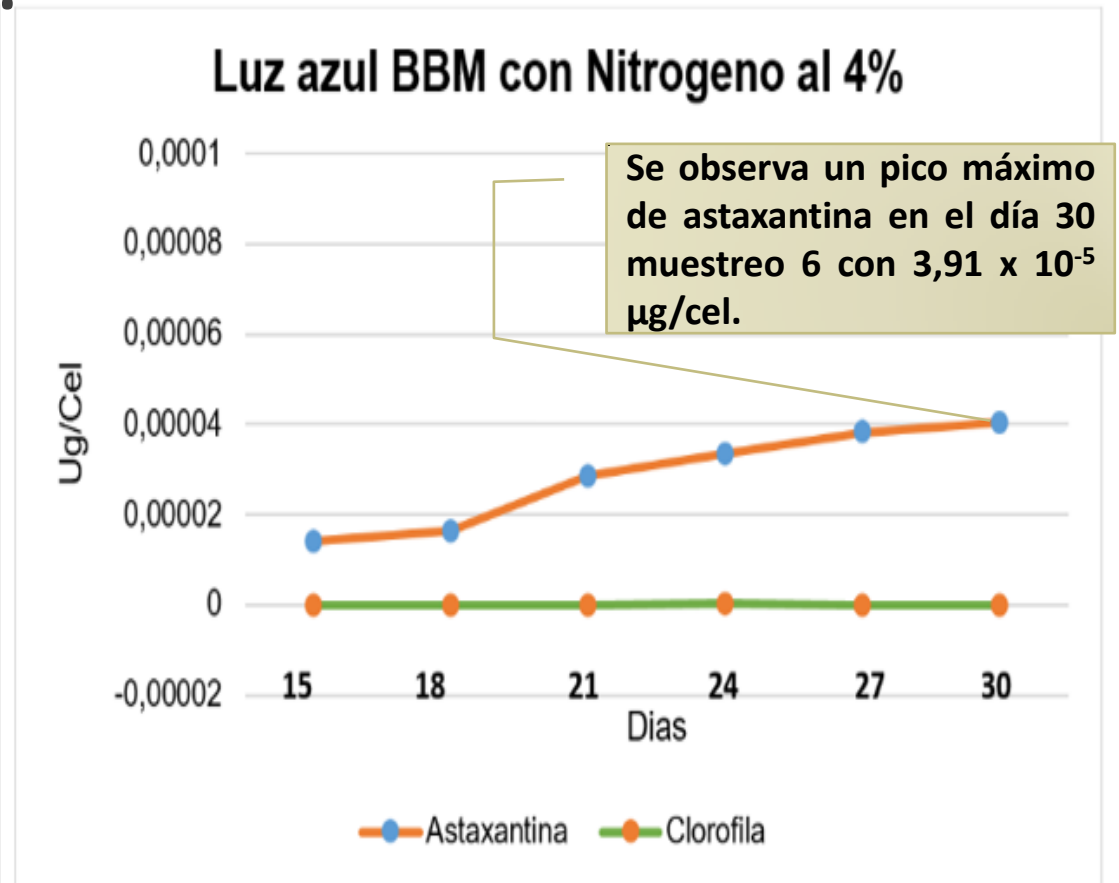
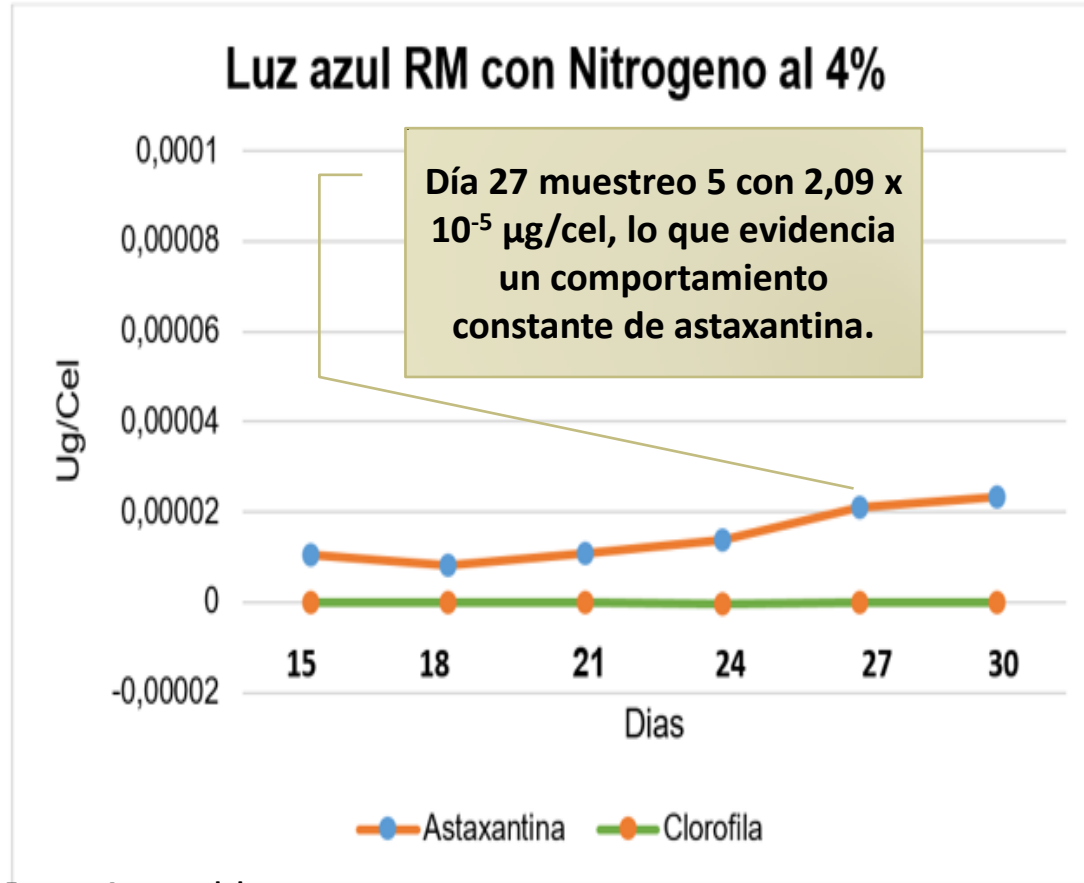
Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento control con luz blanca medio RM con nitrógeno al 4%



Fuente: Autores del proyecto

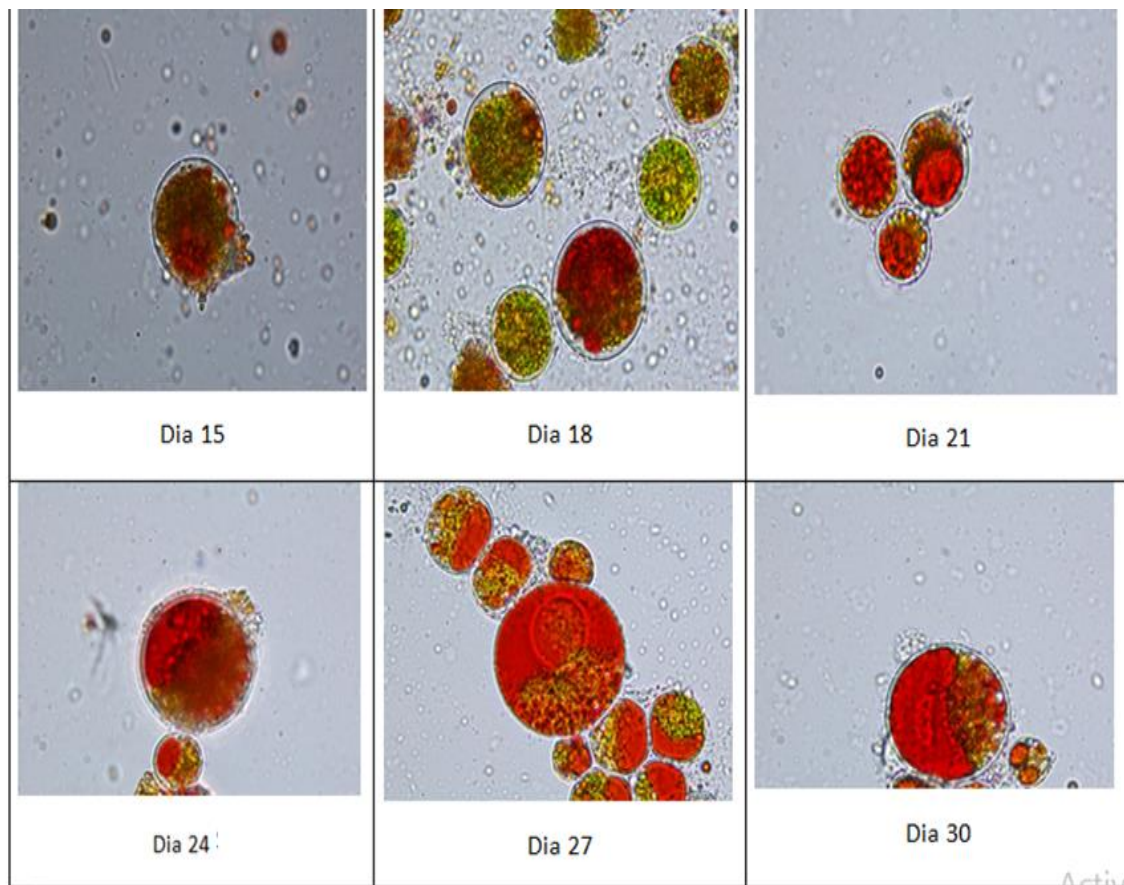


Graficas de producción de Clorofila y Astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con Nitrógeno al 4.0% y luz azul como factores de estrés



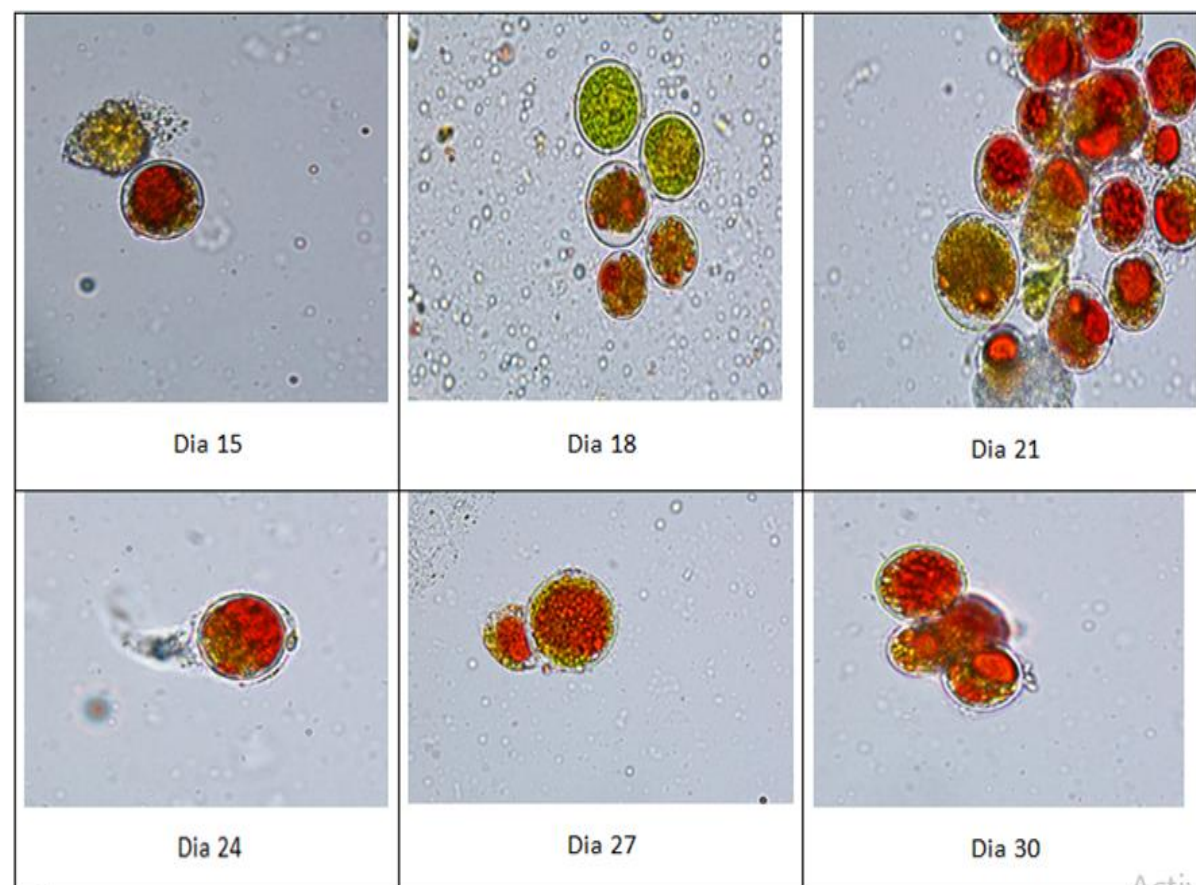
Fuente: Autores del proyecto

Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio BBM con nitrógeno al 4.0%.



Fuente: Autores del proyecto

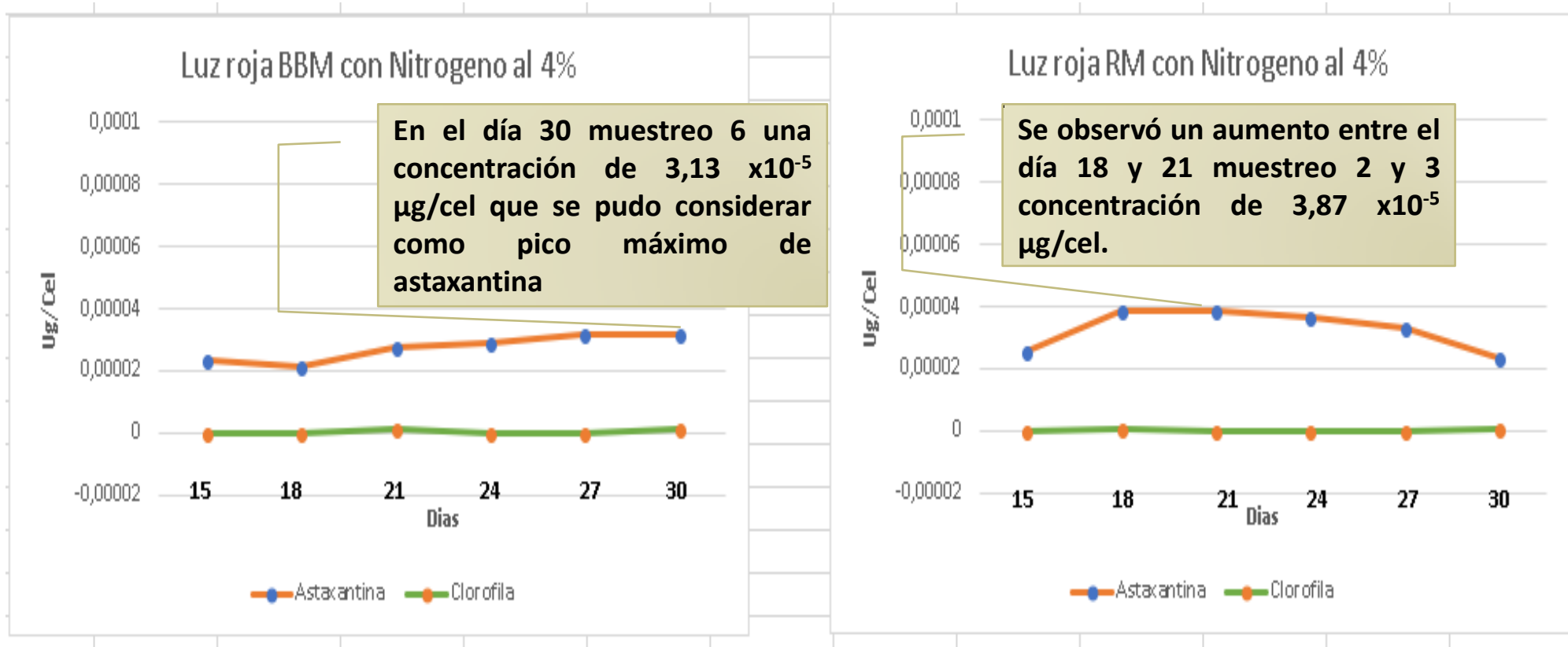
Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento con luz azul medio RM con nitrógeno al 4.0%.



Fuente: Autores del proyecto



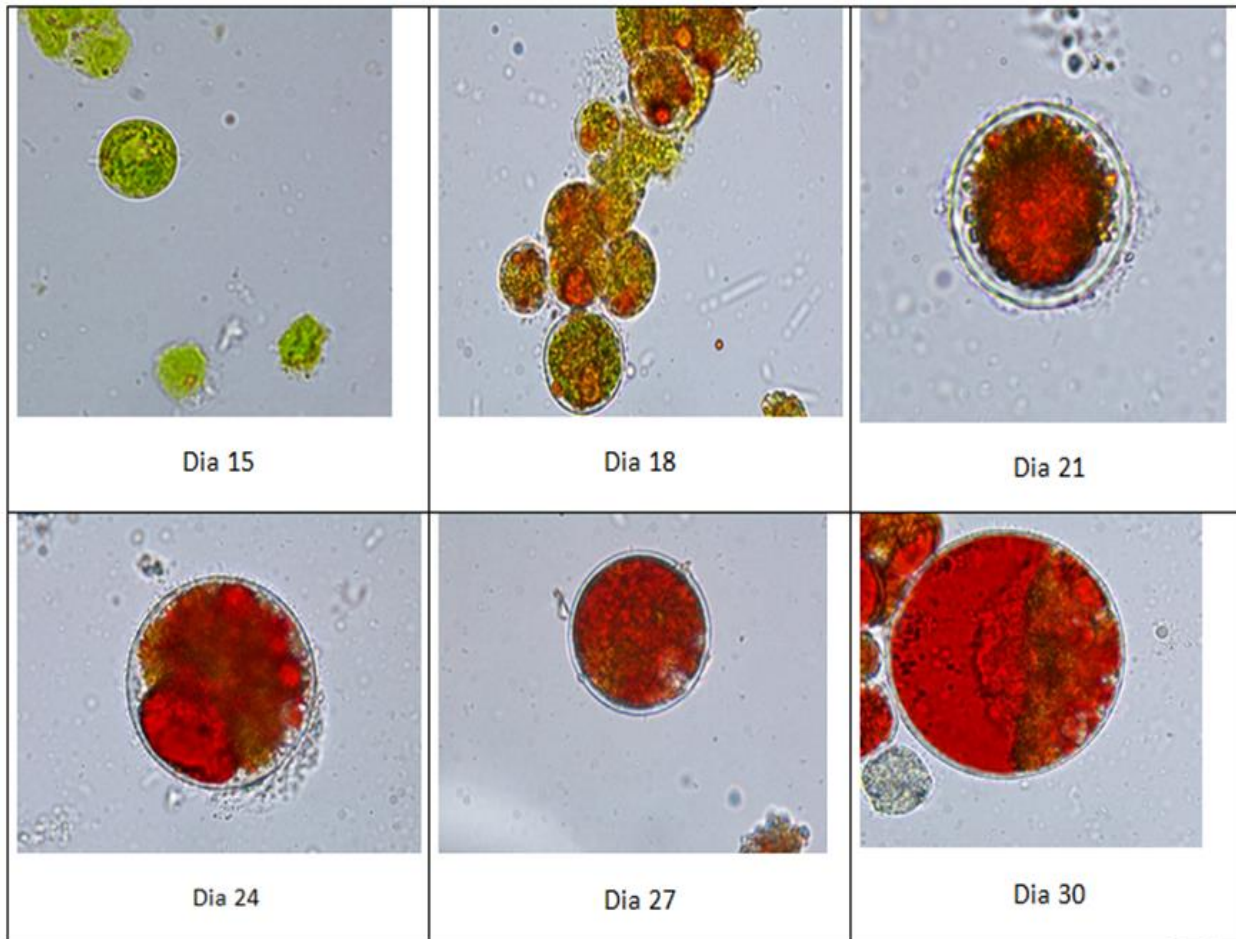
Grafica producción de Clorofila y Astaxantina $\mu\text{g}/\text{cel}$ con Nitrógeno al 4.0% y luz roja como factores de estrés.



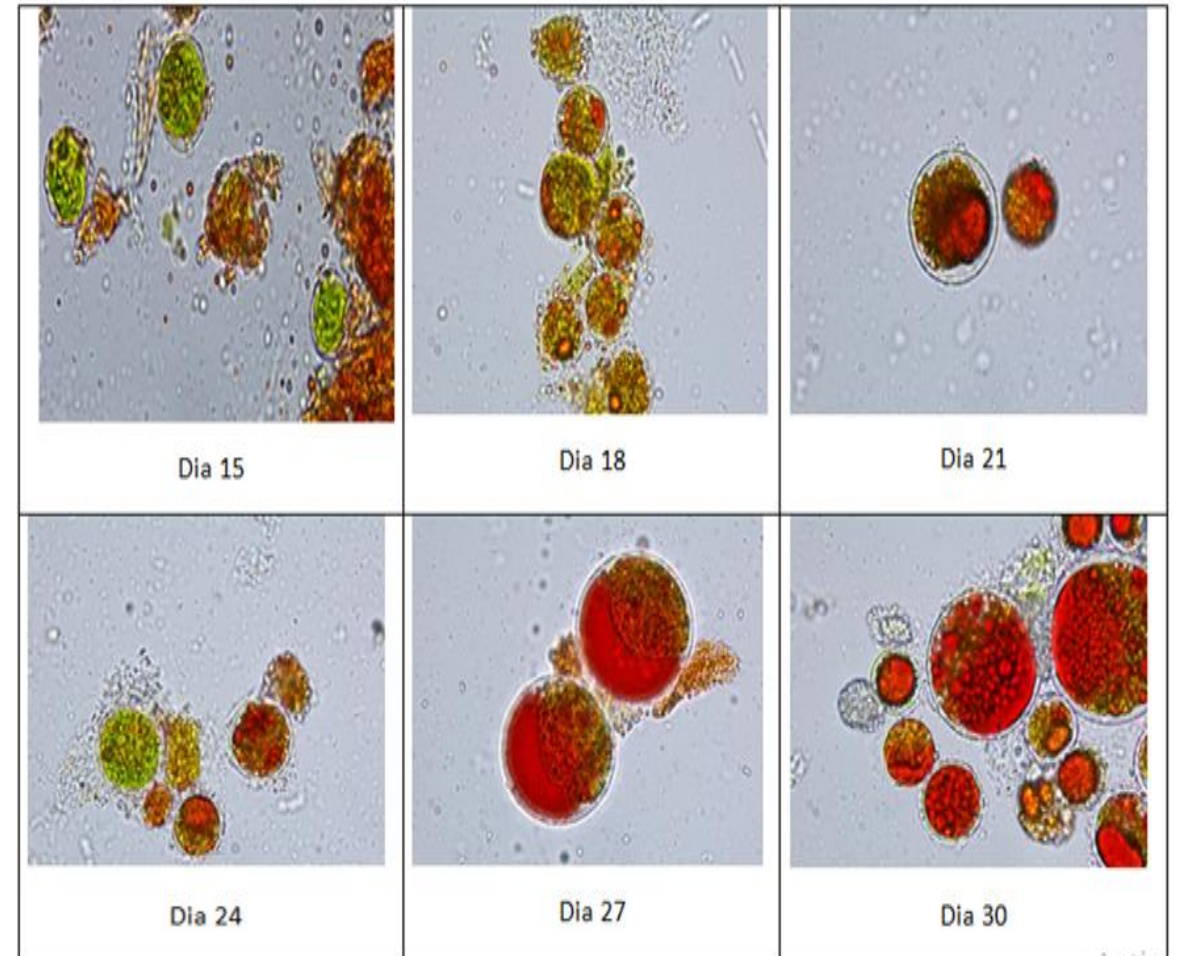
Fuente: Autores del proyecto

Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento con luz roja medio BBM con nitrógeno al 4.0%

Registro fotográfico de la morfología celular tratamiento con luz roja medio RM con nitrógeno al 4.0%



Fuente: Autores del proyecto



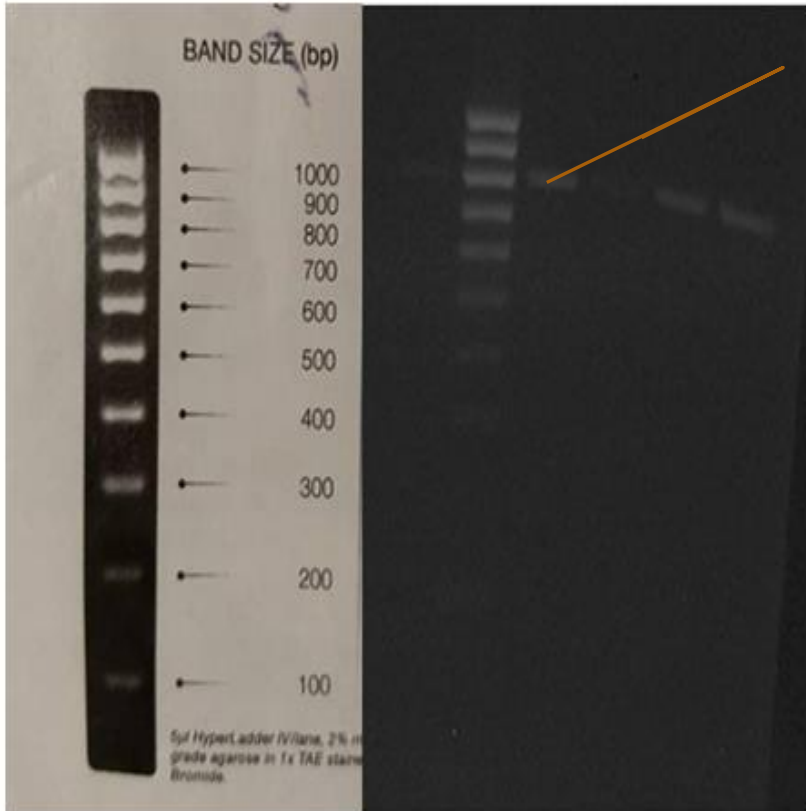
Fuente: Autores del proyecto

Activar

Luz-Medio	1er Tratamiento (Variacion del color de luz)	2do Tratamiento (Variacion del color de luz y concentracion al 4% de Nitrogeno)
Blanca-BBM	$6,7 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$	$4.06 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$
Blanca-RM	$8,1 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$	$5,42 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$
Azul-BBM	$6,4 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$	$3,91 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$
Azul-RM	$5,8 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$	$2,09 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$
Roja-BBM	$7,24 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$	$3.13 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$
Roja-RM	$6,49 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$	$3,87 \times 10^{-5} \mu\text{g/cel}$

ANÁLISIS MOLECULAR

M M1 M2 M5 M6

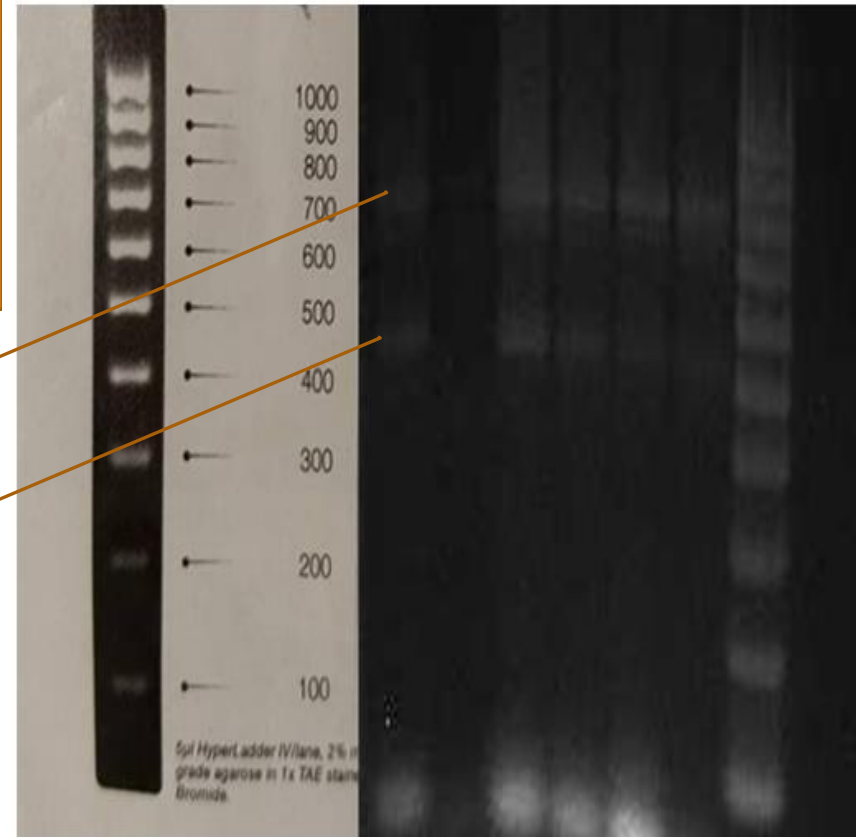


Presencia de cDNA
evidenciado por las bandas
características que muestran
un peso molecular
de aproximadamente 800
pb, ITS 4

ITS 4 800 pb

ITS 1 600 pb

M3 M4 M7 M8 M9 M10 M



Expresión de Housekeeping muestras 3,4,7,8,9 y 10.

Fuente: Autores del proyecto

Expresión de Housekeeping muestras 1,2,5, y 6.
Primer Tratamiento

Fuente: Autores del proyecto

M11 M12 M13 M14 M15 M16 M17 M M18

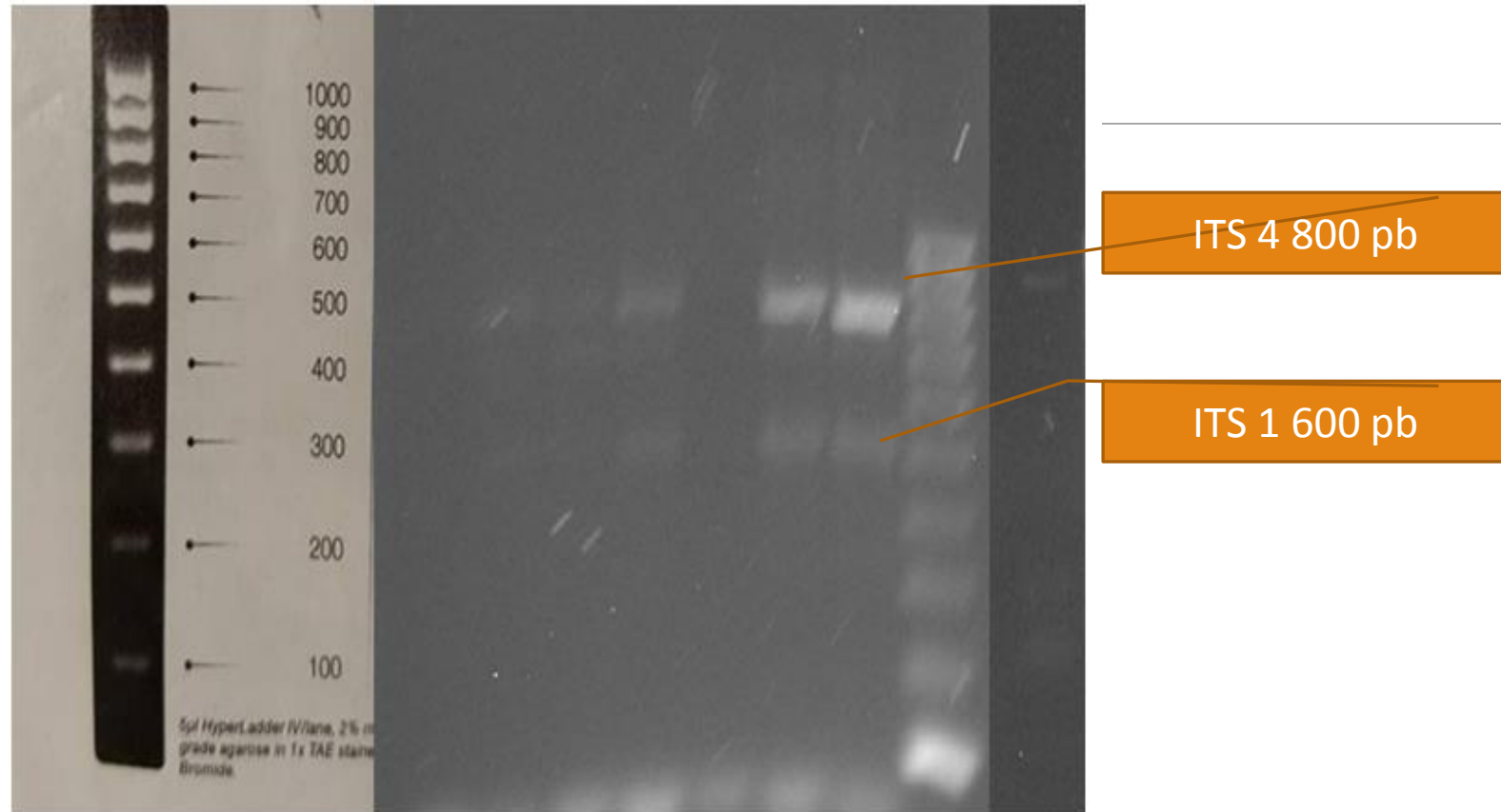
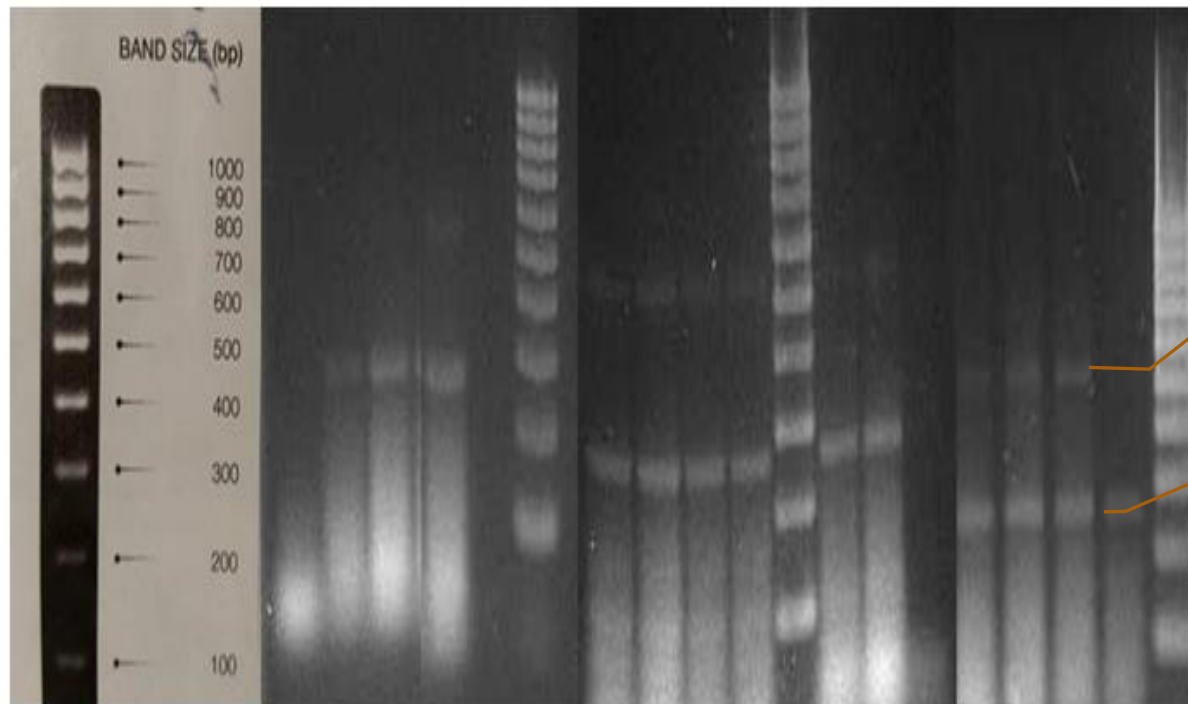


Imagen 3 Expresión de Housekeeping muestras 11 a la 18.

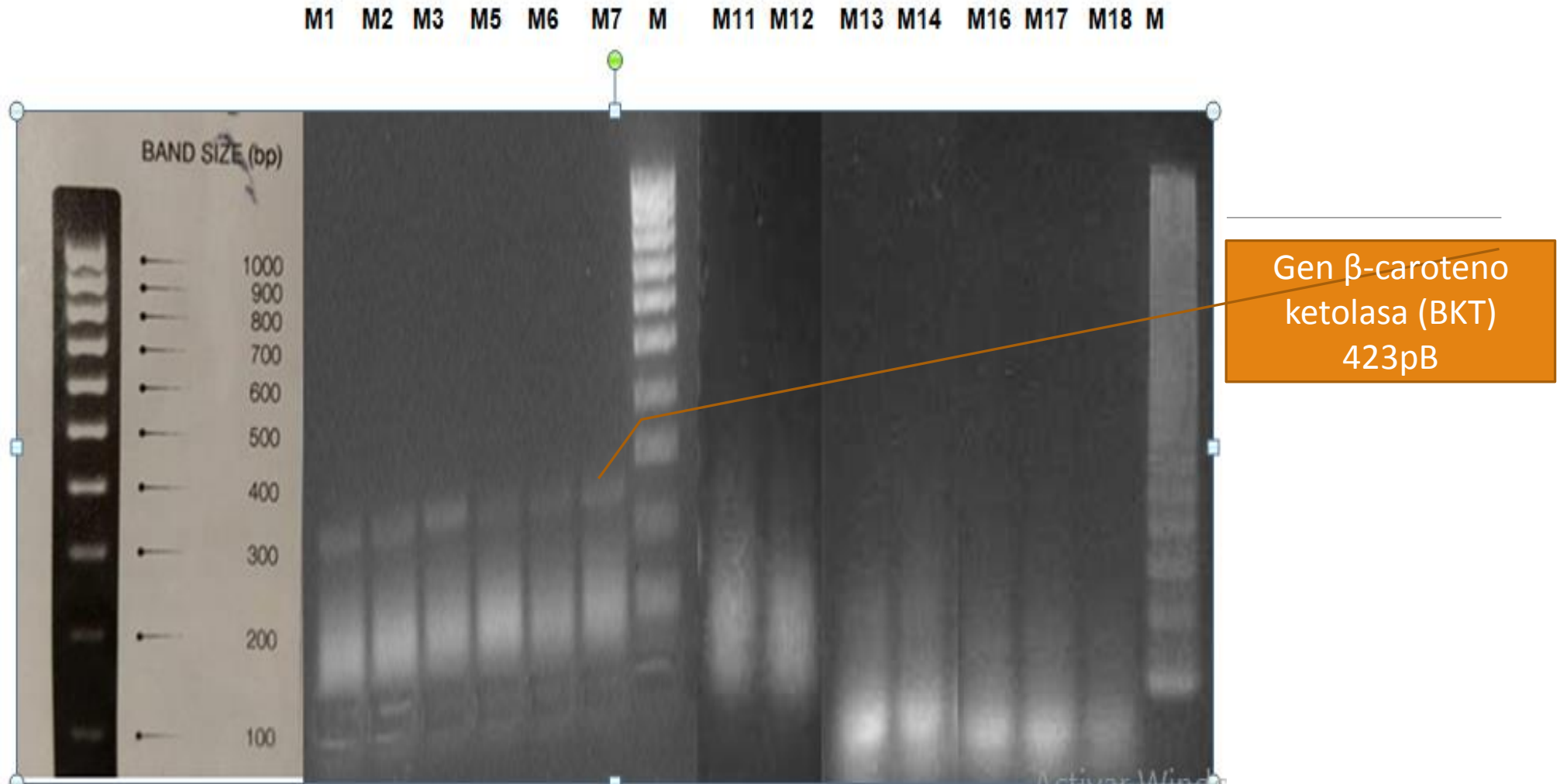
Fuente: Autores del proyecto

EXPRESIÓN DE GENES DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE ASTAXANTINA

M1 M2 M3 M5 M6 M M7 M8 M9 M10 M M11 M12 M13 M14 M16 M17 M18M



Expresión de los genes fitoeno sintetasa (PSY)402 pb, β-caroteno Hidroxilasa (CHY) 521 en las muestras 1 a la 18

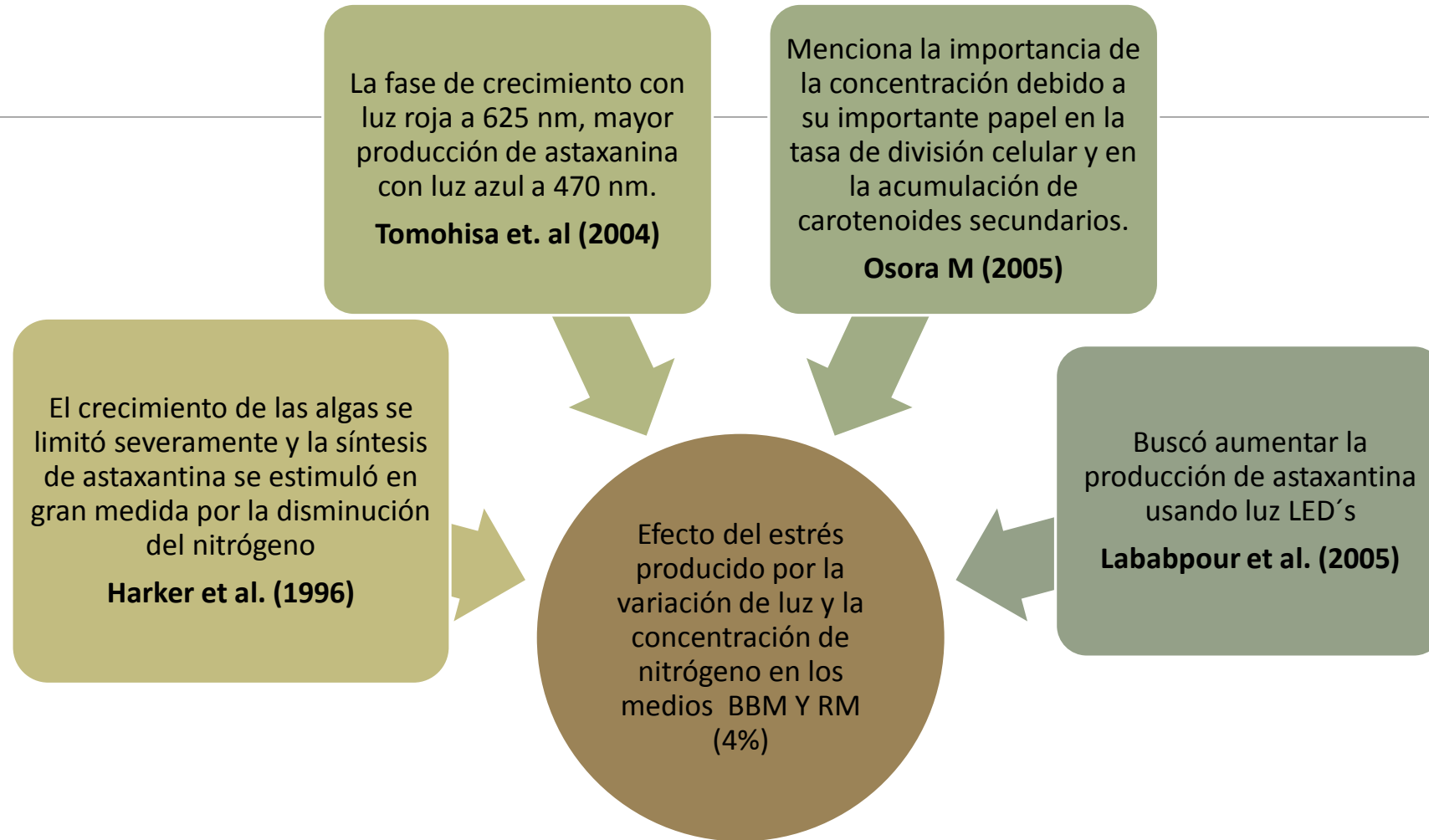


Expresión de genes fitoeno desaturasa (PDS) 462pB, licopeno β -ciclase (LCY)565pB, β -caroteno ketolasa (BKT) 423pB , en muestras de la 1 a la 18 a excepción de la muestra 8 a la 10

Fuente: Autores del proyecto



Discusión



Concentraciones de nitrógeno de 1.0, y 1.25 g/L y cambio de luz blanca a luz roja, obtuvieron como resultado en el transcurso del cultivo que se afectara el crecimiento y el desarrollo poblacional de la microalga

Lima (2009)

el estrés nutricional de la microalga, las altas intensidades y variación de luz inducen la expresión de los genes biosintéticos de la astaxantina

Vidhyavathi et al (2008)

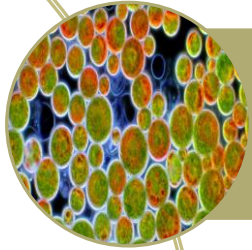
Realizó un ensayo para medir el efecto de diferentes concentraciones de nitrato de sodio en el medio de cultivo BBM; sobre el crecimiento celular y analizó el efecto de estrés por luz

Espinaco (2016)

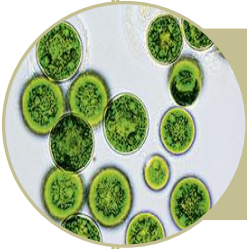
Efecto del estrés producido por la variación de luz y la concentración de nitrógeno en los medios BBM Y RM (4,0 %)



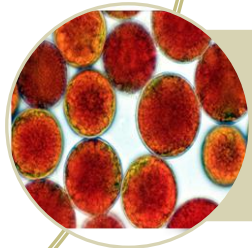
Conclusiones



Con el uso de la variación de color de luz como factor de estrés se observó que las mayores concentraciones de astaxantina se obtuvieron con la luz roja en el medio BBM, alcanzó un pico máximo en el día 18 de $7.24 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{cel}$



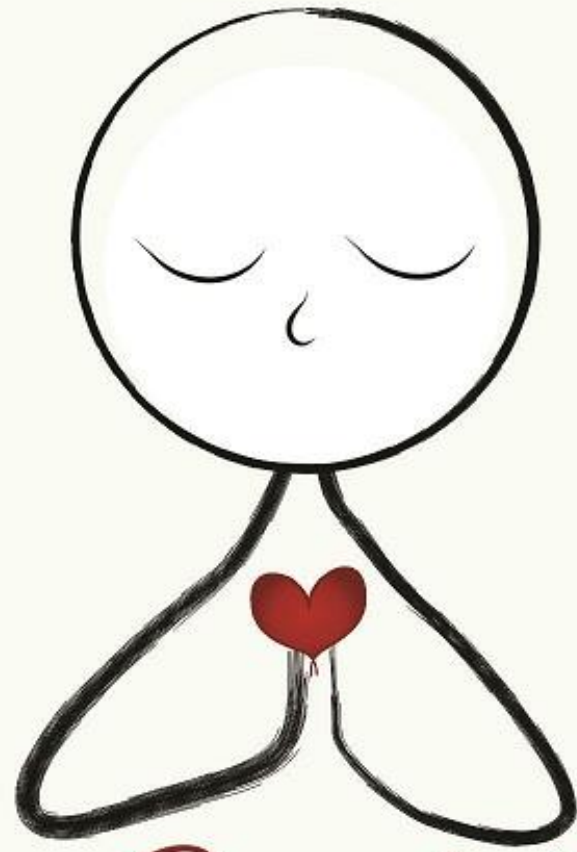
La producción de astaxantina se vio afectada debido al uso del nitrógeno al 4% desde la primera fase evidenciando una disminución en la densidad celular y la producción precoz de astaxantina.



La variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno como factores de estrés, indujeron la expresión de los genes como el PSY que se expresó en un 87,5% y el CHY en un 62,5% del total de las muestras analizadas, se evidenció que la unión de los dos factores se pueden utilizar como métodos de estrés óptimos para promover mayor acumulación del caroteno.

Recomendaciones

- Debido a los resultados obtenidos se recomienda el uso de dos o mas factores de estrés para promover una producción y acumulación mas rápida de astaxantina por parte de *H.pluvialis*
- Se recomienda usar nitrógeno al 4.0% solamente en la fase de estrés , ya que durante la fase de crecimiento afecta el crecimiento y la tasa de división celular.
- Es importante tomar muestra al inicio y al final de la fase de estrés, debido a que algunos genes se expresan al final de la producción de astaxantina.



Gracias