



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Estudio sobre el crecimiento y síntesis de metabolitos de importancia comercial en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* bajo tratamientos fitohormonales

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Bióloga

Constanza Daniella Aguayo Molina

Concepción, Marzo 2024



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en FICOLAB, Grupo de Investigación Microalgal del departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

Prof. Guía

Dra. Patricia Gómez

Prof. Co Guía

Dr. Pablo Castro

Prof. Evaluadores

Dra. Fabiola Cruces

Dr. Enrique Ostria

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, Marzo 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al proyecto FONDEF ID-22110127 por el apoyo económico para la financiación de esta tesis.

Mis agradecimientos son principalmente dirigidos al equipo FICOLAB por toda la comprensión, apoyo y cariño, son unas personas maravillosas.

A la profesora Patricia por todos los conocimientos entregados, la paciencia y confianza en épocas de aprendizaje, fue una excelente guía en estos dos últimos años de carrera. A Pablo de igual forma por sus conocimientos, sus clases y recomendaciones que siempre me ayudaron mucho. A Sandra Bobadilla (Sandrita), por todo su apoyo y cariñosa presencia.

A todos los presentes en el equipo, por sus cálidos recibimientos en estos últimos pasos de la era universitaria, fue una experiencia muy enriquecedora trabajar con ustedes. Sin dejar de incluir a los tesisistas (Cami y Diego) con los que tuve que compartir en este tiempo, los apoyos mutuos, risas y ayudas siempre serán agradecidas.

Por último, sin dejar pasar mis sinceros agradecimientos a mi familia por inculcarme siempre las enseñanzas necesarias para ser la mujer que soy hoy en día. A mi madre y abuelo, por todo y más, gracias a ustedes estoy en esto. A mi abuela, te extrañare por siempre. A mi gatita, por darme sus terapias de ronroneo en momentos de estrés y ansiedades extremas. Y mi familia elegida, mis amigas del alma, por sus terapias (más quejas de la vida que terapias), las risas y compañía en todo este proceso. A todos y más, gracias por siempre estar.

INDICE

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 3 |
| INDICE..... | 4 |
| INDICE DE FIGURAS | 6 |
| INDICE DE TABLAS | 7 |
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT | 10 |
| INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| <i>Características generales Microalgas/Diatomeas</i> | 12 |
| <i>Phaeodactylum tricornutum y sus principales metabolitos de importancia biotecnológica</i> | 14 |
| <i>Fitohormonas y su efecto en cultivos de Microalgas</i> | 15 |
| HIPOTESIS | 18 |
| OBJETIVOS..... | 19 |
| <i>Objetivo general:</i> | 19 |
| <i>Objetivos específicos:</i> | 19 |
| METODOLOGÍA..... | 20 |
| <i>Material biológico</i> | 20 |
| <i>Aclimatación de Cultivos: Cultivos con adición de fitohormonas</i> | 20 |
| 1. Evaluación del efecto de distintas concentraciones de fitohormonas en el crecimiento de la cepa. | 20 |
| 2. Cultivo de la cepa en volúmenes de 1L a la concentración de fitohormona seleccionada..... | 21 |
| <i>Análisis de Crecimiento:</i> | 22 |
| <i>Fluorescencia in vivo de la Clorofila a</i> | 23 |
| <i>Análisis bioquímicos:</i> | 24 |
| <i>Análisis de Datos</i> | 28 |
| RESULTADOS..... | 29 |
| Evaluación del efecto de distintas fitohormonas en el crecimiento de la cepa..... | 29 |
| Cultivo de la cepa en volúmenes de 1L a la concentración de fitohormona seleccionada | 30 |
| a) Contenido de lípidos totales | 34 |

| | |
|---|----|
| b) Perfil de ácidos grasos:..... | 35 |
| c) Proteínas totales..... | 39 |
| d) Carbohidratos totales | 39 |
| e) Fenoles totales | 40 |
| f) Contenido de clorofilas y carotenoides totales:..... | 41 |
| DISCUSIÓN..... | 45 |
| CONCLUSIONES..... | 50 |
| BIBLIOGRAFIA | 51 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: <i>Curvas de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 expuestas a diversos tratamientos hormonales</i> | 29 |
| Figura 2: <i>Curva de crecimiento cepa CCM-UdeC 264, según el tratamiento seleccionado con sus respectivos controles (sin replicas)</i> | 30 |
| Figura 3: <i>Curvas de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 bajo tratamientos de la fitohormona kinetina</i> | 31 |
| Figura 4: <i>Curvas de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 bajo tratamientos de la fitohormona ácido abscisico (ABA)</i> | 31 |
| Figura 5: <i>Tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{máx})</i> | 33 |
| Figura 6: <i>Enfriamiento no fotoquímico máximo (NPQ_{max})</i> | 34 |
| Figura 7: <i>Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m)</i> | 34 |
| Figura 8: <i>Composición lipídica de la cepa CCM-UdeC 264</i> | 35 |
| Figura 9: <i>Contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la cepa CCM-UdeC 264</i> | 36 |
| Figura 10: <i>Contenido de proteínas totales en cepa CCM-UdeC 264</i> | 39 |
| Figura 11: <i>Contenido de carbohidratos totales en cepa CCM-UdeC 264</i> | 40 |
| Figura 12: <i>Contenido de fenoles totales en cepa CCM-UdeC 264</i> | 41 |
| Figura 13: <i>Contenido de clorofila a en la cepa CCM-UdeC 264</i> | 42 |
| Figura 14: <i>Contenido de clorofila c en la cepa CCM-UdeC 264</i> | 42 |
| Figura 15: <i>Contenido de carotenoides en la cepa CCM-UdeC 264</i> | 43 |
| Figura 16: <i>Contenido de fucoxantina en la cepa CCM-UdeC 264</i> | 43 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| <i>Tabla 1: Cantidades utilizadas para la preparación de concentraciones hormonales a evaluar.....</i> | <i>20</i> |
| <i>Tabla 2: Parámetros de crecimiento cepa CCM-UdeC 264.....</i> | <i>32</i> |
| <i>Tabla 3: Análisis de ácidos grasos presentes en la biomasa de cepa CCM-UdeC 264... </i> | <i>37</i> |

RESUMEN

Phaeodactylum tricornutum es una diatomea marina reconocida por su riqueza en lípidos y en sustancias altamente valiosas, ha sido objeto de extensos estudios debido a sus bioproductos con aplicaciones industriales y biotecnológicas. Entre estos compuestos destaca el ácido graso poliinsaturado ácido eicosapentaenoico (EPA), perteneciente al grupo omega-3, y el carotenoide fucoxantina, ambos compuestos de gran importancia por sus beneficios farmacológicos y nutracéuticos tanto en salud humana como animal. Actualmente, la fuente de ácidos grasos omega-3 es el aceite de pescado obtenido de la pesca extractiva, industria ampliamente cuestionada por su falta de sustentabilidad ambiental. Dada la alta demanda de estos aceites es de suma importancia disponer de nuevas fuentes de producción renovable y sustentable, donde el cultivo de microalgas como *P. tricornutum* emergen como una alternativa promisoriosa. Una estrategia prometedor para mejorar y potenciar la producción de compuestos de interés comercial en microalgas es el empleo de fitohormonas, que han sido originalmente utilizadas en plantas superiores, pero su uso en microalgas está ganando fuerza debido a que han demostrado su capacidad para potenciar la acumulación de diversos metabolitos (primarios y secundarios) y estimular el crecimiento de cultivos en diversas especies. En este estudio se investigó el efecto de la suplementación con fitohormonas en cultivos de una cepa de *Phaeodactylum tricornutum* originaria del sur de Chile. Se evaluó el efecto de las fitohormonas: ácido giberélico (GA3), ácido indol 3-acético (AIA) y Kinetina (KIN) en el crecimiento de la cepa. De dichas hormonas, se seleccionó a kinetina a una concentración de 0.5 ppm, para generar cultivos en volúmenes de 1 L. Además, se evaluó a la fitohormona ácido abscísico (ABA) en una concentración de 2mg/ml. Los resultados mostraron un incremento significativo en la densidad celular máxima alcanzada por los cultivos en presencia de Kinetina, mientras que los cultivos con ácido abscísico no mostraron variaciones en el crecimiento. Se evaluaron los parámetros fotobiológicos durante el tiempo de cultivo, detectándose un incremento en el ETRmax al principio y al final de los cultivos expuestos a ABA, los valores de NPQ no mostraron una tendencia clara; mientras que el valor de Fv/Fm incrementó en todos los tratamientos a partir del día 4 de cultivo. Respecto al análisis bioquímico de la biomasa, se obtuvo que los lípidos totales disminuyeron en presencia de kinetina y ABA y el EPA disminuyó sólo en presencia de ABA. Los tratamientos

con las hormonas no afectaron el contenido de proteínas, carotenoides totales ni fucoxantina; mientras que el ABA incrementó el contenido de carbohidratos y disminuyó el contenido de fenoles totales y clorofilas (a y c). Se concluye que los tratamientos con las hormonas kinetina y ABA, en las condiciones evaluadas no afectan significativamente el crecimiento y la acumulación de metabolitos de interés comercial en la cepa de *P. tricornutum* estudiada.

ABSTRACT

Phaeodactylum tricornutum is a marine diatom recognized for its richness in lipids and highly valuable substances and has been the subject of extensive studies due to its bioproducts with industrial and biotechnological applications. Among these compounds are the polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid (EPA), belonging to the omega-3 group, and the carotenoid fucoxanthin, both compounds of great importance for their pharmacological and nutraceutical benefits in both human and animal health. Currently, the source of omega-3 fatty acids is fish oil obtained from extractive fishing, an industry widely questioned for its lack of environmental sustainability. Given the high demand for these oils, it is of utmost importance to have new sources of renewable and sustainable production, where the cultivation of microalgae such as *P. tricornutum* emerges as a promising alternative source. A promising strategy to improve and enhance the production of compounds of commercial interest in microalgae is the use of phytohormones, which have been originally used in higher plants, but their use in microalgae is gaining strength because they have demonstrated their ability to enhance the accumulation of various metabolites (primary and secondary) and stimulate crop growth in various species. In this study, the effect of phytohormone supplementation in cultures of a *Phaeodactylum tricornutum* strain from southern Chile was investigated. The effect of the phytohormones gibberellic acid (GA3), indole 3-acetic acid (IAA) and Kinetin (KIN) on the growth of the strain was evaluated. Of these hormones, kinetin was selected at a concentration of 0.5 ppm, to generate cultures in 1 L volumes. In addition, the phytohormone abscisic acid (ABA) was evaluated at a concentration of 2 mg/ml. The results showed a significant increase in the maximum cell density reached by the cultures in the presence of Kinetin, while the cultures with abscisic acid showed no variation in growth. Photobiological parameters were evaluated during the culture time, detecting an increase in ETR_{max} at the beginning and at the end of the cultures exposed to ABA, NPQ values did not show a clear trend, while the F_v/F_m value increased in all treatments from day 4 of culture. Regarding the biochemical analysis of biomass, total lipids decreased in the presence of kinetin and ABA and EPA decreased only in the presence of ABA. The hormone treatments did not affect protein, total carotenoids or fucoxanthin content, while ABA increased carbohydrate content and decreased total phenols and

chlorophylls (a and c). It is concluded that the treatments with the hormone's kinetin and ABA, under the conditions evaluated, did not significantly affect the growth and accumulation of metabolites of commercial interest in the strain of *P. tricornutum* studied.

INTRODUCCIÓN

Características generales Microalgas/Diatomeas

Las microalgas corresponden a un grupo filogenético diverso caracterizado por ser organismos fotosintéticos que constituyen la base de la cadena alimentaria acuática (Hayes et al., 2017). Han sido ampliamente estudiadas, debido a su capacidad de producción fitoquímica de alto valor y a la utilización del dióxido de carbono como materia prima, que potencia soluciones de fabricación económicas y sostenibles con el ambiente (Butler et al., 2020).

La clase Bacillariophyceae (diatomeas) es un grupo perteneciente al fitoplancton eucariota que ha subsistido a lo largo de los años, con una distribución mundial global, lo cual evidencia la alta variabilidad y diversificación característica en ellas (Celi et al., 2022). Estos organismos unicelulares cumplen funciones directamente relacionados con los principales ciclos biogeoquímicos como la captación de carbono, la producción de oxígeno y el reciclaje de nutrientes como el nitrógeno, carbono y silicio; se les atribuye un 20% de la fijación global del carbono (Hockin et al., 2012) y más del 20% de la producción de oxígeno a nivel mundial mediante el proceso de fotosíntesis (Celi et al., 2022). Además, proporcionan una gran cantidad de materia prima que es destinada mayoritariamente como alimento a los demás organismos acuáticos (Not et al., 2012).

Con el paso de los años, se han encontrado diferentes aplicaciones industriales derivadas de las microalgas, como lo son la industria alimentaria, cosmetológica, farmacológica, así como herramientas para el tratamiento de aguas residuales y producción de biocombustibles (Lum et al., 2013); esto es debido al descubrimiento de un gran espectro de compuestos bioactivos en la biomasa de las microalgas, tales como ácidos grasos, pigmentos, vitaminas o compuestos extracelulares como lo son los oligosacáridos (Raposo et al., 2013). Debido a la interesante composición bioquímica y capacidad productora de valiosos metabolitos de las diatomeas, es que se logra evidenciar claramente como pueden ser una materia prima potencial para diversos propósitos del ámbito biotecnológico, presentando además una ventaja por su alta capacidad de adaptación en ambientes, ya sea de agua dulce como marina; es decir una adaptabilidad a la variación en las condiciones de nutrientes que a su vez proporcionan altas tasas de producción de biomasa (Celi et al., 2022).

Los metabolitos de gran importancia que se pueden encontrar en los cloroplastos de las diatomeas son la clorofila a, c1 y c2, junto con los pigmentos secundarios o accesorios, como lo son las xantofilas y los carotenos (Celi et al., 2022), dentro de los cuales destaca el pigmento carotenoide fucoxantina, el cual es responsable de darles la coloración marrón a estas microalgas. La fucoxantina es el pigmento secundario más abundante en estos organismos, debido a que es un pigmento captador de luz junto a la clorofila a y c, que juntos constituyen el complejo fucoxantina-proteína clorofila (FCP) y por lo mismo, son consideradas como fuentes potenciales de este compuesto de alto valor comercial (Pereira et al., 2021). La fucoxantina posee aplicaciones importantes para la salud humana y animal, como efectos anticancerígenos, anti-obesidad, antioxidantes, antiinflamatorios entre otros (Peng et al., 2011).

Los carotenoides son metabolitos asociados a la fotoprotección celular, en situaciones donde la variabilidad en la intensidad lumínica amenaza con asimilar demasiada energía lumínica y comprometer la productividad fotosintética mediante fotoinhibición, es decir, cuando la energía de la luz se absorbe más allá de la capacidad fotosintética de las células, lo cual puede provocar una oxidación de cualquier pigmento, lípido o proteína y dañar el aparato fotosintético (Jallet et al., 2016). Para prevenir la fotoinhibición las diatomeas han desarrollado una variedad de procesos de defensa, como la epoxidación de la diatoxantina, involucrada en la disipación de energía a través del enfriamiento no fotoquímico (NPQ) el cual permite la fotoaclimatación del sistema de captación de luz (Kooistra et al., 2007).

De igual forma, existen metabolitos de almacenamiento de energía de alto valor como lo son los lípidos y carbohidratos, este último encontrándose como insolubles, siendo azúcares asociados al frústulo y solubles como la crisolaminarina, polisacáridos extracelulares y azúcares libres (Caballero et al., 2016). Con respecto a los tipos de lípidos en estas microalgas, se pueden encontrar: triacilglicéridos (TAG), esteroides y oxilipinas; predominando la presencia de ácidos grasos en las membranas de las diatomeas comprendiendo entre el 15% y 20% de su biomasa; cabe destacar que los ácidos grasos de diatomeas, específicamente los ácidos grasos poliinsaturados del grupo ω -3, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) han sido ampliamente visibilizados durante los últimos años por su rol como sustancias bioactivas y nutrientes

esenciales promotores de la salud humana (Celi et al., 2022), incluyendo a la salud ocular, desarrollo cerebral, prevención a condiciones cardíacas y antienvjecimiento (Sirisuk et al., 2018). Es importante destacar, que actualmente la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) proviene del aceite de pescado mediante la industria pesquera, la cual ha generado una discusión por los inconvenientes asociados principalmente a la contaminación marina y la preocupante sobreexplotación pesquera (Moon et al., 2019); este último aspecto es preocupante, puesto que la Organización Mundial de la Salud actualmente recomienda un consumo nutricional de EPA y DHA de 500 mg/día, correspondiendo así una extracción de gran alcance para satisfacer el consumo humano, por lo cual es de suma importancia el desarrollo de nuevas alternativas sustentables para la producción de dichos ácidos grasos (Udayan et al., 2020., Wang et al., 2022).

***Phaeodactylum tricornutum* y sus principales metabolitos de importancia biotecnológica**

Dentro de las diatomeas marinas *Phaeodactylum tricornutum* es una de las especies más ampliamente estudiadas (Celi et al., 2022). Esta microalga posee una característica celular polimórfica, correspondiente a tres morfotipos diferentes: ovalado, fusiforme y/o trirradiado; cuya aparición se atribuye a las condiciones fluctuantes de crecimiento, relacionadas principalmente a las condiciones de cultivo como la salinidad, pH y temperatura (Song et al., 2020). Esta diatomea es considerada como una prometedora fuente para la producción de metabolitos de alto valor agregado, como el carotenoide fucoxantina y el ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-3: ácido eicosapentaenoico (EPA) (Kim et al., 2012). Con respecto a su composición bioquímica; en condiciones normales de crecimiento esta especie puede acumular cerca de 20% de proteínas, 26% de carbohidratos y 18% de lípidos con respecto a su peso seco (Kim et al., 2012).

Por otro lado, *P. tricornutum* posee una característica relevante y es que es una especie de crecimiento rápido, lo cual la hace apta para la generación de cultivos a gran escala (Celi et al., 2022). De igual manera, esta diatomea posee una alta adaptación a diversos medios de cultivo, como también a la variación en los parámetros de estos cultivos por ser una especie bastante plástica desde el punto de vista fisiológico, que la clasifica como una especie de gran potencial para la producción comercial de sus bioproductos de alto valor (Haro et al., 2017).

El contenido de lípidos en esta especie puede variar entre el 18% y 60% por peso seco dependiendo de las condiciones de cultivo (Yang et al., 2014). Cabe destacar, que *P. triornutum* puede acumular hasta un 36% de EPA en sus ácidos grasos totales, por lo cual se considera como una fuente prometedora para su producción (Jesionowska et al., 2023). Además de la síntesis de EPA, se consideran como metabolitos de gran importancia biotecnológica abundantes en esta especie: la fucoxantina y la crisolaminarina, por ser productos bioactivos naturales de alto valor beneficioso para la salud humana, por lo cual poseen variadas perspectivas de aplicaciones farmacéuticas (Kim et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, la fucoxantina aislada de microalgas tiene una amplia bioactividad farmacológica la cual incluye la actividad antioxidante, anti-obesidad, anticancerígena, antidiabética, anti fotoenvejecimiento, anti angiogénica y anti metastásica (Gómez et al., 2015). Sin embargo, la mayoría de los estudios del ámbito farmacológico se han desarrollado con fucoxantina aislada de macroalgas y muy pocos enfocados a fuentes microalgales como *Phaeodactylum triornutum* cuyo contenido puede alcanzar 16,33mg/g de biomasa seca, es decir aproximadamente 1.63% del peso seco, según estudios anteriores (Kim et al., 2012).

Fitohormonas y su efecto en cultivos de Microalgas

Las fitohormonas son moléculas de señalización que actúan en bajas concentraciones; originalmente utilizadas en plantas superiores (Fierli et al., 2022), que influyen directamente sobre el crecimiento y desarrollo, como también en las rutas biosintéticas (Taiz et al., 2015). Las fitohormonas han sido utilizadas en cultivos de microalgas por su potencial efecto positivo en el crecimiento y mejoras en los rendimientos de producción de metabolitos como pigmentos, carbohidratos y proteínas (Fierli et al., 2022; Jäger et al., 2010).

Hay una amplia diversidad de hormonas vegetales estimulantes de procesos celulares relevantes, como la división celular en el caso de las citoquinas y el crecimiento celular en el caso de las auxinas (Park et al., 2013). Las fitohormonas reconocidas como las más importantes son el ácido indol acético (AIA), el ácido giberélico (GA3), la kinetina (KIN) y el ácido abscísico (ABA) (Udayan et al., 2018). Las funciones que cumplen estas hormonas en plantas superiores son ampliamente reconocidas, por ejemplo; IAA es una auxina que estimula el crecimiento de las células vegetales, la formación de brote en plantas superiores

y la formación de raíces; GA3 por otro lado, es una giberelina utilizada generalmente para propósitos de alargamiento celular y germinación de semillas; KIN es una hormona del grupo de las citoquinas que promueve la división celular y la formación de brotes en plantas; y por último, ABA es una hormona reguladora de estrés en células vegetales que induce a reacciones de protección al estrés ambiental abiótico, como lo son los choques osmóticos, la desecación y/o las bajas temperaturas (Yoshida et al., 2003).

Aunque, el papel fisiológico de las hormonas vegetales se centra en plantas superiores, y las microalgas comparten similitudes de la fisiología con ellas (Udayan et al., 2018), las funciones de estas fitohormonas no se han establecido firmemente en microalgas (Park et al., 2013). Se han hecho correlaciones con la evolución de las plantas superiores a partir del sistema metabólico primario de las microalgas primitivas, por lo cual la vía de biosíntesis de hormonas vegetales desarrolladas en las plantas superiores modernas se podría haber originado en microalgas antiguas (Lu & Xu, 2015). Por lo tanto, el mecanismo de acción de las fitohormonas puede ser similar para ambos tipos de organismos, lo cual en consecuencia permitiría el uso de estas hormonas sobre cultivos de microalgas y así lograr regular de manera positiva parámetros de crecimiento y reproducción de microalgas, junto con la tolerancia al estrés (Stirk et al., 2013; Shah et al., 2022).

Debido a esto, existen varios estudios que se centran en los efectos producidos por diversas hormonas vegetales sobre microalgas; como la observación de que el ABA influye mayormente en la biosíntesis de lípidos, comparada con otras hormonas; o el aumento en el crecimiento, la concentración de clorofila y el contenido de proteínas y lípidos para la producción de biodiesel en cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* bajo tratamientos con las fitohormonas ABA, GA3, KIN, TRIA (1- triacontanol) y IAA (Park et al., 2013). En general los estudios han demostrado que al proporcionar concentraciones adecuadas de fitohormonas se puede promover la división celular en microalgas, mejorar la actividad fotosintética, aumentar la biomasa, en conjunto con el contenido de aceite, clorofila y proteínas (Mousavi et al., 2016; Lu & Xu 2015; Han et al., 2018). El ácido giberélico (GA3) ha presentado efectos sobre microalgas con respecto al aumento en crecimiento en conjunto con incrementos en la producción de metabolitos tales como clorofila a, lípidos, ácidos grasos y carotenoides en especies como *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana* (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012;

Jusoh et al., 2019; Madani et al., 2021). En *P. tricornutum* se ha observado alta acumulación de biomasa y de metabolitos como ácidos grasos (EPA) y pigmentos carotenoides (fucoxantina) bajo tratamiento de GA3 (Han et al., 2018; Fierli et al., 2022). El ácido indol acético junto a la Kinetina han evidenciado un aumento de biomasa y aumento en el contenido de lípidos y carotenoides sobre especies de microalgas tales como *C. vulgaris*, *C. reinhardtii*, *C. sorokiniana* y *Acutodesmus obliquus* expuestas a medios de cultivos estresantes (Park et al., 2013; Babu et al., 2017; Renuka et al., 2017).

Cabe destacar que la acumulación de lípidos y carbohidratos en microalgas está vinculada al estrés ambiental debido a cambios físicos y químicos (Chokshi et al., 2017; Qi et al., 2019). Aunque esta estrategia es eficiente, el crecimiento de las microalgas se ve limitado, reduciendo la acumulación de biomasa; debido a esto es que se han estudiado hormonas vegetales para combatir este estrés oxidativo y mejorar el crecimiento y acumulación de energía. La aplicación de fitohormonas específicas puede tener efectos positivos y negativos, por lo que diversas investigaciones implementaron el uso de combinaciones para equilibrarlos y obtener beneficios complementarios (Shah et al., 2022). Para ejemplificar tales combinaciones; hay estudios de cultivos tratados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) junto a ácido abscísico en la especie *P. tricornutum* que generaron aumentos tanto en biomasa como en el contenido de lípidos, en conjunto con cierto aumento en la producción de ácidos grasos, carbohidratos y proteínas (Zhang et al., 2021). También hay estudios con la especie *Chlorella pyrenoidosa*, la cual bajo combinación de las fitohormonas ácido indol acético y aminoetil hexanoato de dietilo generó un aumento en el crecimiento a ciertas concentraciones, como también un incremento en la acumulación de carotenoides y ácidos grasos (Xu & Xiong, 2023).

Como se desprende de los antecedentes anteriores si bien existen estudios del efecto de algunas fitohormonas sobre cepas de *P. tricornutum*, la información es escasa y no parece ser concluyente para generalizarla a toda la especie, de modo que en esta propuesta se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo afecta la suplementación con fitohormonas al crecimiento y composición bioquímica de una cepa chilena de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*?

HIPOTESIS

Dentro de las investigaciones microalgales con fitohormonas, existe una amplia variación de información dentro de muchas especies altamente conocidas que han generado resultados prometedores desde una mirada biotecnológica; sin embargo, no existe mucha información de esta área en la especie *Phaeodactylum tricornutum*, la cual ha sido valorada actualmente por su alta importancia en la producción de metabolitos como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el carotenoide fucoxantina, entre otros. Evaluar cultivos de esta especie expuesta a tratamientos con distintas fitohormonas conocidas como promotoras de crecimiento o reguladoras del estrés abiótico, podría confirmar el efecto de ciertas hormonas sobre la especie para la generación de biomasa y acumulación de ciertos metabolitos en ella. Considerando lo anterior y los antecedentes recopilados, es que se plantea la siguiente hipótesis:

La suplementación del cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* con las fitohormonas: ácido giberélico, ácido indol acético, kinetina y ácido abscísico, en ciertas concentraciones, permite aumentar su crecimiento y la acumulación de bioproductos de alto valor agregado en su biomasa.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el efecto de fitohormonas en el crecimiento y acumulación de bioproductos de interés comercial en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivos específicos:

Evaluar si existen diferencias en los parámetros de crecimiento entre cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* suplementados con las fitohormonas: ácido giberélico, ácido indol acético, kinetina y ácido abscísico, en distintas concentraciones

Determinar si la suplementación con las fitohormonas seleccionadas en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum*, aumenta la acumulación de metabolitos de interés comercial en su biomasa.

METODOLOGÍA

Material biológico

Se utilizó una cepa de la especie *Phaeodactylum tricornutum* proveniente de la Bahía de Chiloé (X región de los Lagos, Chile), actualmente depositada en la Colección de Cultivo de Microalgas de la Universidad de Concepción, bajo el código CCM-UdeC 264.

La cepa es mantenida en medio Walne (Walne, 1970), a una temperatura de $16\pm 2^{\circ}\text{C}$, una irradiancia continua de $60\ \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 16:8 (L:O).

Aclimatación de Cultivos: Cultivos con adición de fitohormonas

1. Evaluación del efecto de distintas concentraciones de fitohormonas en el crecimiento de la cepa.

Se realizaron cultivos en condiciones controladas (sala de cultivo), en medio de cultivo Walne (1970) suplementado con triple aporte de nitrato y fosfato, en volúmenes de 80 ml, DFF $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo 16:8 (L:O) y temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$,

Las concentraciones finales de las tres fitohormonas a evaluar preliminarmente en los cultivos se detallan a continuación, con sus respectivas preparaciones en la Tabla 1:

- Ácido giberélico: 1; 2; 4 y 8 ppm
- Kinetina: 0.5; 1; 2 y 4 ppm
- Ácido indol-3-acético: 0.5; 1; 2 y 4 ppm

Los cultivos se iniciaron a una densidad de 250.000 células/ml en un volumen de 80ml. Se realizó conteo celular de los cultivos cada dos días, para construir sus curvas de crecimiento y determinar los parámetros de crecimiento: tasa de crecimiento y densidad celular máxima de los cultivos.

Tabla 1: Cantidades utilizadas para la preparación de concentraciones hormonales a evaluar, disueltas en sus correspondientes solventes y añadidas a cultivos de 80 ml.

| Solución stock de fitohormona | Concentración | Solvente | Cantidad de hormona (μl) | Cantidad de solvente (μl) | Control |
|-------------------------------|---------------|----------|---------------------------------------|--|---------|
|-------------------------------|---------------|----------|---------------------------------------|--|---------|

| | | | | | |
|------------------|--------|--------------------|------|------|---------------------------|
| GA3 (6400ppm) | 1ppm | Etanol 0M 31,7% | 12,5 | 87,5 | 100 µl Etanol 0M 31,7% |
| | 2ppm | | 25 | 75 | |
| | 4ppm | | 50 | 50 | |
| | 8ppm | | 100 | - | |
| KIN (3750ppm) | 0,5ppm | KOH 1M | 11 | 74 | 85 µl KOH 1M |
| | 1ppm | | 21 | 64 | |
| | 2ppm | | 43 | 42 | |
| | 4ppm | | 85 | - | |
| AIA (3750ppm) | 0,5ppm | KOH 1M | 11 | 74 | 85 µl KOH 1M |
| | 1ppm | | 21 | 64 | |
| | 2ppm | | 43 | 42 | |
| | 4ppm | | 85 | - | |

2. Cultivo de la cepa en volúmenes de 1L a la concentración de fitohormona seleccionada

Una vez seleccionada la concentración de la fitohormona que más estimuló el crecimiento de la cepa se establecieron 4 réplicas de cultivo en volúmenes de 1L, con aireación constante (aire filtrado a 0,2 µm) en las mismas condiciones de luz y temperatura indicadas anteriormente, con una densidad inicial de 300.000 células/ml.

Con el objetivo de evaluar el efecto de ácido abscísico, principalmente en la producción de fucoxantina, se evaluó su adición en la mitad de la fase de crecimiento en cultivos de *P. tricornutum*. La concentración de ácido abscísico a evaluar fue de 2mg/L.

En cada caso se establecieron como control 4 réplicas, sin adición de fitohormona, pero adicionándoles el respectivo solvente utilizado para disolver la hormona (para kinetina KOH 1M y para ABA etanol al 98%). El objetivo de este ensayo fue verificar el efecto de la fitohormona en el crecimiento de la cepa y obtener biomasa suficiente para su posterior análisis bioquímico.

Se realizó el control de crecimiento del cultivo incluyendo conteo celular y peso seco (este último sólo el día de la cosecha). Al finalizar el cultivo se procedió a cosechar la totalidad de la biomasa de cada matraz por centrifugación a 3000 rpm por 6 minutos a 4°C, se lavó la biomasa con formiato de amonio y se liofilizó por aproximadamente 48 horas, obteniendo la biomasa seca la cual se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Posteriormente, la biomasa fue sometida a análisis de cuantificación de lípidos totales (espectrofotometría), de ácidos grasos (cromatografía de gas), clorofila y carotenoides totales, cuantificación de fucoxantina, proteínas, carbohidratos y fenoles totales (espectrofotometría).

Análisis de Crecimiento:

- a) *Conteo celular:* Las células fueron contabilizadas cada 48 horas a través de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Los resultados se expresaron como densidad celular por volumen de cultivo (células/ml). Con los datos obtenidos, se construyeron curvas de crecimiento, mediante las cuales se calcularon tasas de crecimiento en la fase exponencial de cada tratamiento, utilizando la fórmula de Guillard, (1973) y expresando el resultado como divisiones por día:

$$K = (3.322/t_2 - t_1) \times (\text{Log } N_2/N_1)$$

Donde N_1 y N_2 corresponden al número de células por ml en los días t_1 y t_2 respectivamente.

Además, de la curva de crecimiento se estimó la densidad celular máxima (capacidad de carga) de cada cultivo tratado, incluido los cultivos controles.

- b) *Peso seco:* En el último día de cada cultivo, se secaron en una estufa a 80°C filtros de nitrocelulosa (de poro 0,45 μm) por 24 horas. Posteriormente, se enfriaron los filtros en un desecador, se pesaron y se filtró a través de ellos una alícuota de 10 ml de cultivo lavando con 10 ml de formiato de amonio 0.5 M. Luego, los filtros con la biomasa retenida se secaron nuevamente a 80°C por 48 horas, para luego enfriarlos y pesarlos.

Los valores obtenidos del peso de los filtros con biomasa se restaron con los valores obtenidos del filtro limpio, el valor obtenido se dividió por el volumen filtrado, correspondiendo este al peso seco de la biomasa algal por volumen de cultivo (mg/ml).

Fluorescencia in vivo de la Clorofila a: La medida de fotosíntesis *in vivo* basado en la determinación de la fluorescencia de la clorofila *a* asociada al fotosistema II (P680) fue cuantificada utilizando un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (JUNIOR PAM) controlado por el software WinControl v3.25 (Walz GmbH, Germany). Para cada tratamiento se recolectaron cada 2 días 10ml de cada replica depositándolos en cámaras de incubación para realizar curvas de luz rápida (RLC). Las muestras se mantuvieron en oscuridad por un tiempo de incubación de 15 min para determinar la fluorescencia basal (F_0), posterior a esto se aplicaron pulsos de saturación, determinando la fluorescencia máxima (F_m). Con los datos obtenidos se calculó el rendimiento cuántico máximo de PSII (F_v/F_m) de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

siendo,

$$F_v = F_m - F_0$$

F_0 es la fluorescencia basal con ambiente oscuro durante 15 min y F_m es la fluorescencia máxima después de una luz de saturación $>4000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (Luz actínica azul).

La tasa de transporte de electrones (ETR) se calculó mediante la siguiente ecuación, expresada por unidad de área:

$$\text{ETR} = \Delta F/F'_m \times E \times A \times F_{II} \text{ (}\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}\text{)}$$

Donde $\Delta F/F'_m$ es el rendimiento cuántico efectivo. E es la irradiancia incidente PAR y F_{II} es la fracción de clorofila relacionada con el PSII, siendo 0.8 para algas pardas (Figueroa et al. 2003). A corresponde a la absorptancia de los tratamientos evaluados, la cual es la fracción de luz absorbida por el cultivo y medida por el método de capa fina para suspensiones celulares (2 a 3 mm) según lo indicado por Castro-Varela et al. (2021):

$$A = 1 - E_p/E_m$$

donde E_p/E_m es la transmitancia (T); E_p es la irradiancia transmitida por el cultivo microalgal y E_m es la irradiancia transmitida por el medio de cultivo. Ambos medidos a 5cms con el ángulo del coseno-correctado del cuantometro PAR (LI-COR Company, Nebraska).

Finalmente, el rendimiento no fotoquímico (NPQ) se calculó utilizando los valores de fluorescencia obtenidos por el procedimiento RLC de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$$

Donde F_m es la fluorescencia máxima después de la aplicación del pulso de luz de saturación tras la incubación de 15 min en oscuridad y F_m' después de la aplicación del pulso de luz de saturación posterior 20 s de incubación en cada tratamiento evaluado. Los valores (ETR_{max} y NPQ_{max}) fueron obtenidos usando el modelo matemático tangencial propuesto por Eilers & Peeters (1988).

Análisis bioquímicos:

El último día de los cultivos se cosecharon los volúmenes completos de cada cultivo por centrifugación a 3000 rpm por 5 min, a 4°C. La biomasa obtenida se lavó con formiato de amonio 0.5 M y luego se liofilizó para su análisis, según se indica a continuación:

- a) *Extracción y cuantificación de lípidos totales:* De la biomasa microalgal seca, se tomaron 30 mg y se depositaron en viales de plástico adecuados para el homogenizador FastPrep. Luego se agregó 1 mL de metanol y dos esferas de homogenización. Se aplicaron 8 ciclos de homogenización de 4,0 m/s, 20 seg/ciclo. El lisado se transfirió a un tubo de vidrio al cual se agregó 1,5 ml de cloroformo y 0,8 ml de agua destilada. Los tubos se homogenizaron en vortex por 30 seg, se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron a 4°C por 24 h. Posterior a esto, se centrifugaron a 3200 rpm durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante y transfiriéndolo a un tubo limpio. Luego, se adicioneo al sobrenadante 1,5 ml de cloroformo y 1,6 ml de agua destilada (agitando hasta obtener una solución homogénea y densa), la solución se centrifugo a 3200 rpm durante 10 min, retirando y eliminando la fase superior acuosa. La fase clorofórmica se traspasó a tubos de vidrio limpios para finalmente, agregar 500 µl de acetona para eliminar las trazas del agua. Las muestras se dejaron evaporar en estufa a 38°C por 3 días. Las muestras secas de lípidos se resuspendieron en 1 mL de cloroformo:metanol 1:2, protocolo descrito por Bligh y Dyer (1959). El contenido de lípidos totales de las biomasas se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Marsh y Weinstein (1966), en las muestras de lípidos resuspendidas y analizadas en submuestras de 50 µl, por triplicado, para cada tubo.

Luego, se agregó 2 ml de H₂SO₄ concentrado a cada tubo (incluyendo un tubo sin lípidos que se usara de blanco). Los tubos deben ser tapados con papel aluminio para posteriormente incubarlos en estufa a 200°C durante 15 minutos y luego enfriarlos a -20°C durante 5 minutos. Posteriormente se añadió 8 ml de agua destilada a cada tubo, homogenizando y nuevamente enfriarlos a -20°C. Por último, se procedió a leer las absorbancias de cada muestra en un espectrofotómetro a 375 nm, en el cual previamente se debe realizar una curva de calibración con el triglicérido tripalmitina como estándar.

- b) *Perfil de ácidos grasos*: Se tomaron alícuotas de 700 µl de la muestra de lípidos totales obtenida en a) las cuales se evaporaron con N₂(g). Los lípidos fueron derivatizados por adición de 1,3 ml de trifluoruro de boro (BF₃) al 14% en metanol incrementando la volatilidad de la muestra. Luego, el tubo que contenía la mezcla anterior se llevó a un baño de agua de 90°C por 2.5 min, posteriormente se agregó 2 ml de hexano y 1 ml de agua, agitando en vortex durante 1 min, debiendo centrifugar por 10 min a 3200 rpm para obtener 2 fases, una fase apolar donde se disolvieron los ácidos grasos y otra fase polar, concentrado con compuestos no lipídicos. La fase apolar se debió extraer y traspasar a un nuevo vial, donde se evaporaron con nitrógeno gas. La muestra seca se resuspendió con 100 µl de hexano y se inyectó una alícuota de 2 µl en una columna SPB-PUFA del cromatógrafo de gas Clarus 600 PerkinElmer con detector FID (Detector de ionización de llama).

Luego de este procedimiento, se obtuvo un cromatograma, donde se realizó una identificación de ácidos grasos mediante la comparación de sus tiempos de retención con respecto a estándares (Sigma Aldrich) y su cuantificación se llevó a cabo mediante la integración de las áreas bajo los peaks, siendo esos valores expresados como porcentaje del respectivo ácido graso con respecto a los ácidos grasos totales detectados y también en mg de cada ácido graso por g de biomasa seca al utilizar un estándar interno durante la inyección.

- c) *Proteínas totales*: Según el método descrito por Lowry (1951), primero se requirió la preparación de los siguientes reactivos para la extracción de proteínas totales:

- Solución A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1M
- Solución B₁: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5%
- Solución B₂: Tartrato de Sodio y Potasio al 1%
- Solución C: 49 ml de solución A + 1 ml de solución B₁ + 1 ml de solución B₂
- Solución D: Reactivo de Folin Ciocalteau 50% v/v en agua destilada.

Para el análisis, se utilizó 30 mg de biomasa seca almacenadas en tubos de vidrio de 12 ml, a los cuales se les agrego 5 ml de NaOH 0,1 M, aplicando una agitación en vortex por 30 segundos. Luego, los tubos se incubaron a 100°C en placa calefactora por 1 hora, incluyendo un tubo de muestra control (NaOH). Luego de enfriar los tubos se agitaron en vortex y se recolectó una alícuota de 1 ml de muestra en tubos de microcentrifuga (Eppendorf) de 1,5-2 ml, los cuales fueron centrifugados a 7000 rpm durante 15 minutos. Se recolectaron los sobrenadantes resultantes, depositándolos en tubos nuevos. Los sobrenadantes se repartieron por triplicado en un volumen de 25 μl a tubos de vidrio. A dichos tubos, se les añadió 975 μl de NaOH 0,1 M y 1 ml de “solución C”, agitando en vortex y dejando incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se les agrego 100 μl de “solución D”, agitando en vortex y dejando incubar por 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se realizó una lectura de absorbancias en espectrofotómetro a 750 nm. Se calcularon las concentraciones de proteínas totales de acuerdo con la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración construida previamente a partir de seroalbúmina de bovino (BSA) como estándar.

- d) *Carbohidratos totales*: Para la extracción de carbohidratos totales, fue necesaria la preparación del reactivo Antrona- H_2SO_4 : a partir de 0,200 g de antrona en 100 ml de H_2SO_4 96%.

Se utilizó 30 mg de biomasa microalgal seca a la cual se agregó 1 ml de agua destilada y una esfera de cerámica para homogenizarla en homogenizador mecánico FastPrep-24, realizando 8 ciclos a 4,0 m/s durante 20 segundos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 10000 rpm, obteniendo los sobrenadantes resultantes, que fueron trasladados a tubos nuevos.

De estos sobrenadantes se realizó una dilución 1:100, es decir, 10 µl de sobrenadante más 990 µl de agua destilada. En los casos, donde las absorbancias no estuvieron dentro de la curva de calibración, se realizó una dilución 1:200.

Las diluciones se repartieron por triplicado en tubos de vidrio en volúmenes de 250 µl, agregando además 500 µl de reactivo antrona- H₂SO₄, agitando los tubos en vortex para luego dejar enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron a 100°C en placa calefactora. Por último, se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente, para luego realizar la lectura de absorbancias en espectrofotómetro a 625 nm. Las concentraciones de carbohidratos totales se calcularon de acuerdo con la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración, preparada anteriormente utilizando glucosa como estándar.

- e) *Fenoles totales*: Los fenoles fueron extraídos según una adaptación del método descrito por Waterhouse, A.L. (2002); realizando la extracción mediante homogenización (Fast Prep) de 30 mg de biomasa seca con metanol 80% y una esfera de cerámica; la homogenización se realizó en un total de ocho ciclos a 4.0 m/s durante 20 segundos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 5 minutos y 25 µl cada sobrenadante se analizó por triplicado en tubos de vidrio. A cada tubo, se agregó 1,8 ml de agua destilada y 125 µl de reactivo Folin- Ciocalteu dejando incubar las muestras a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, se agregó 375 µl de Na₂CO₃ 20% y 225 µl de agua destilada a cada tubo, dejando incubar por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se realizaron lecturas de las absorbancias a 760nm en espectrofotómetro. Se calcularon las concentraciones de fenoles totales de acuerdo con la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración preparada a partir de ácido gálico como estándar.
- f) *Extracción de clorofilas y carotenoides totales*: Los carotenoides totales fueron extraídos mediante un homogeneizador automático (FastPrep) de una cantidad conocida de biomasa seca (30 mg) con acetona al 90%, de acuerdo con el protocolo descrito por Strickland & Parsons (1972). La homogeneización se realizó en dos ciclos a 4,0 m/s durante 20 segundos, con una posterior centrifugación a 8000 rpm

durante 5 minutos. Los sobrenadantes obtenidos de las muestras se traspasaron a matraces aforados de 10 ml almacenados en oscuridad; este proceso de extracción fue repetido hasta que las muestras perdieron su coloración característica (verde). Los carotenoides y clorofilas totales se cuantificaron mediante espectrofotometría de acuerdo con las expresiones matemáticas propuestas por Wegmann y Metzner (1971), generando una lectura en diversas longitudes de onda (750; 663; 644; 630; 480; 453 y 445nm), que permitieron cuantificar las distintas clorofilas, carotenoides totales y fucoxantina.

Análisis de Datos

Con la finalidad de generar una comparación de los resultados de crecimiento y composición bioquímica en los distintos tratamientos hormonales se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (factor: fitohormonas), utilizando el test de Tukey como test *a posteriori* para detectar las diferencias significativas entre tratamientos. Previo a la aplicación del test se verificó el supuesto de normalidad de datos (Shapiro-Wilk) requerido para la aplicación de la metodología descrita. Se consideró un valor de $p \leq 0,05$ para establecer la significancia estadística de las diferencias (Sokal & Rohlf, 1995). Los datos fueron analizados mediante el software SigmaPlot v.14.5 y GraphPad Prism v.8.0.1.

RESULTADOS

Evaluación del efecto de distintas fitohormonas en el crecimiento de la cepa.

Se evaluaron diferentes fitohormonas asociadas a la promoción del crecimiento en otras microalgas. Se obtuvieron las curvas de crecimiento a 4 concentraciones de cada fitohormona (Fig. 1). La fase exponencial fue alcanzada a los 12 días de cultivo en cada tratamiento. En este ensayo se determinó que la hormona que más promovió el crecimiento fue kinetina aplicada a una concentración de 0.5 ppm (Fig. 2).

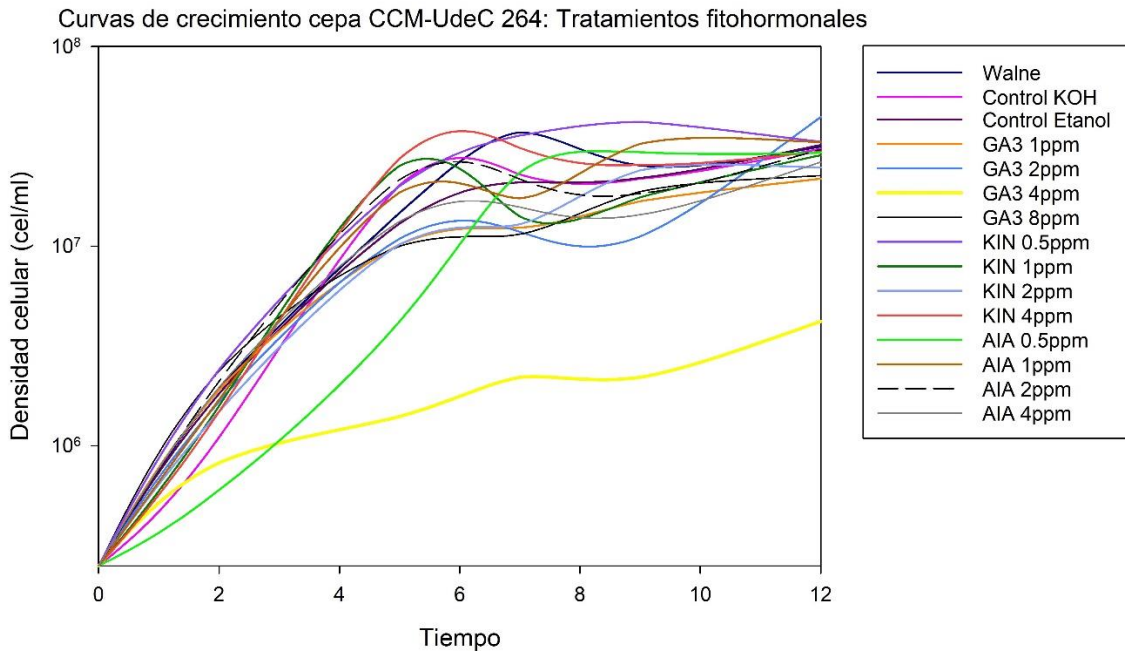


Figura 1: Curvas de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 expuestas a diversos tratamientos hormonales (sin replicas) a cuatro concentraciones cada una.

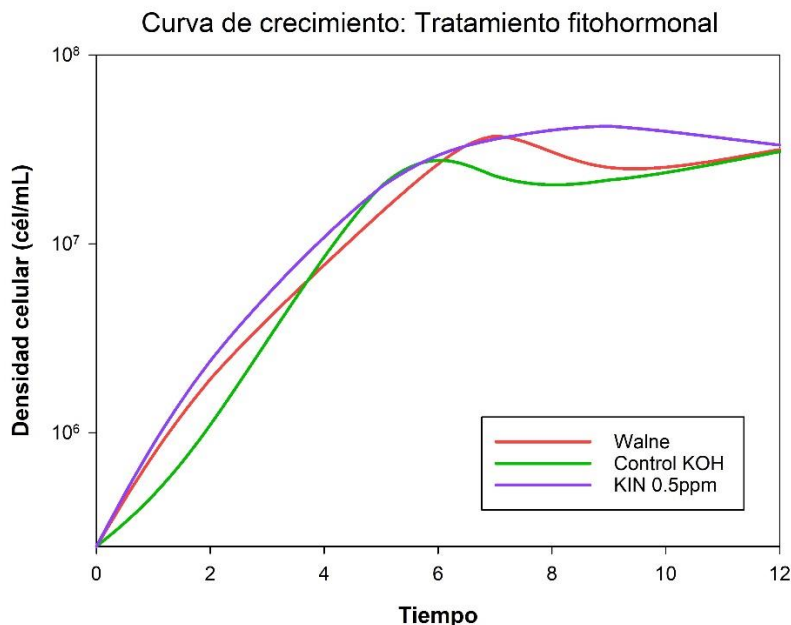


Figura 2: Curva de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 del tratamiento seleccionado (Kinetina 0,5 ppm) con sus respectivos controles (sin replicas).

La tasa de crecimiento del tratamiento seleccionado fue de 1.02 (divisiones/día) alcanzada en la fase exponencial que se evidencio entre los días 2 y 5 del cultivo. Con una densidad máxima de 33.400.000 (cel./ml) alcanzada en la fase estacionaria. El cultivo seleccionado fue posteriormente escalado a un volumen mayor de 1 litro.

Cultivo de la cepa en volúmenes de 1L a la concentración de fitohormona seleccionada

La Figura 3 y 4 muestran las curvas de crecimiento resultantes del tiempo experimental bajo los tratamientos fitohormonales evaluados junto a sus respectivos solventes como control. En ambos casos se puede observar la fase exponencial entre los días 2 y 5, alcanzando la fase estacionaria en el día 12.

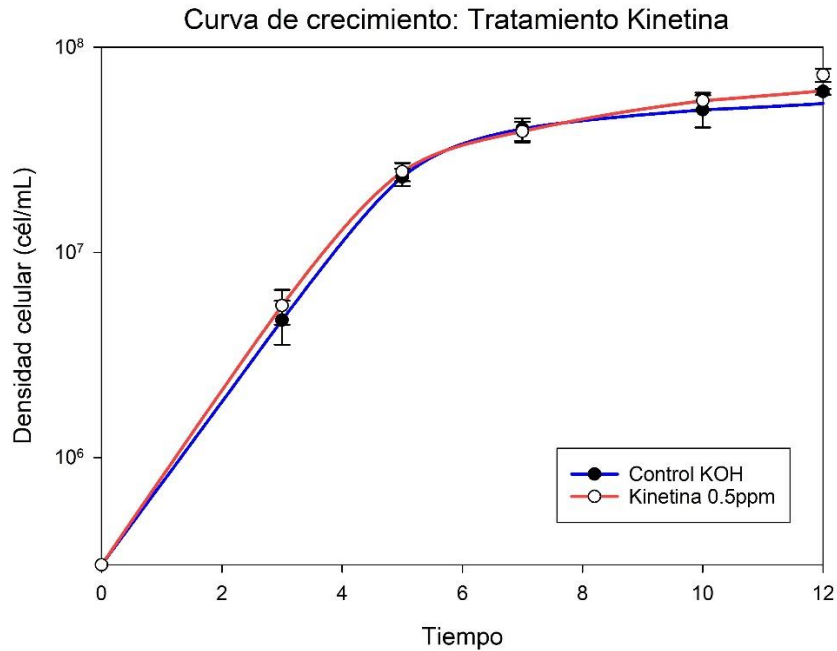


Figura 3: Curvas de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 bajo tratamientos de la fitohormona kinetina en una concentración de 0.5 ppm con su respectivo control (KOH).

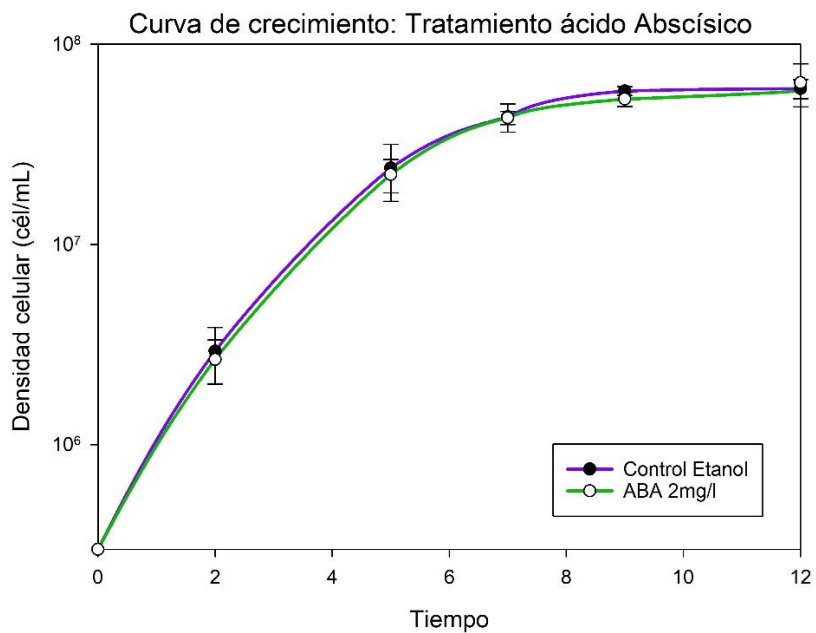


Figura 4: Curvas de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 bajo tratamientos de la fitohormona ácido abscísico (ABA) en una concentración de 2mg/l con su respectivo control (etanol).

La Tabla 2 resume los parámetros de crecimientos de los tratamientos hormonales utilizados y sus respectivos controles (solventes KOH y etanol). Entre los parámetros de crecimiento, se puede evidenciar una clara diferencia con respecto a la densidad máxima alcanzada por los cultivos, mostrando una mayor densidad en cultivos tratados con la hormona Kinetina. En los parámetros de tasa de crecimiento y peso seco no se evidenciaron diferencias significativas.

Tabla 2: Parámetros de crecimiento cepa CCM-UdeC 264 expuesta a tratamientos hormonales. Los valores son expresados en promedios \pm desviación estándar de las 4 réplicas respectivas de cada tratamiento. Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

| Tratamiento | Densidad máxima $\times 10^7$ (cel/ml) | Tasa de crecimiento (div/día) | Peso seco (mg/ml) |
|----------------|---|----------------------------------|------------------------------|
| Control KOH | 6,07 \pm 0,19 ^a | 1,17 \pm 0,19 ^a | 0,86 \pm 0,11 ^a |
| Kinetina | 7,31 \pm 0,55 ^b | 1,09 \pm 0,16 ^a | 0,89 \pm 0,01 ^a |
| Control Etanol | 6,01 \pm 0,66 ^a | 1,01 \pm 0,11 ^a | 0,91 \pm 0,07 ^a |
| ABA | 6,43 \pm 0,15 ^{ab} | 1,03 \pm 0,14 ^a | 0,90 \pm 0,06 ^a |

Analisis fotobiologicos:

La Figura 5 muestra la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) de los tratamientos evaluados en 12 días de cultivo, en general se puede observar una tendencia similar en la mayoría de los tratamientos, a excepción de los cultivos tratados con ácido abscísico que presentaron un aumento de ETR en el inicio y final del tiempo experimental. En el caso de los cultivos expuestos a kinetina, no se evidenciaron diferencias significativas con los controles.

Por otro lado, las mediciones de NPQ (rendimiento no fotoquímico) no reveló tendencias claras entre tratamientos ni días de cultivo (Fig. 6). Los cultivos expuestos a kinetina mostraron aumentos de NPQ (con respecto a su control) en los días 4 y 12. Los cultivos

expuestos a ABA solo presento una disminución de NPQ en el día 4, con respecto a su control (etanol); posterior al día 4 no se mostraron diferencias significativas.

Por último, el rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) mostro un nivel bajo con respecto a la fotoinhibición (bajo a 0,5) en el inicio de los cultivos; aun así, en el resto del tiempo experimental se mantuvo una tendencia mucho mayor en todos los tratamientos analizados alcanzando valores entre 0.6 y 0.7. En general los cultivos expuestos a las fitohormonas analizadas no mostraron ser afectados significativamente en cuanto a su actividad fotosintética (Fig. 7).

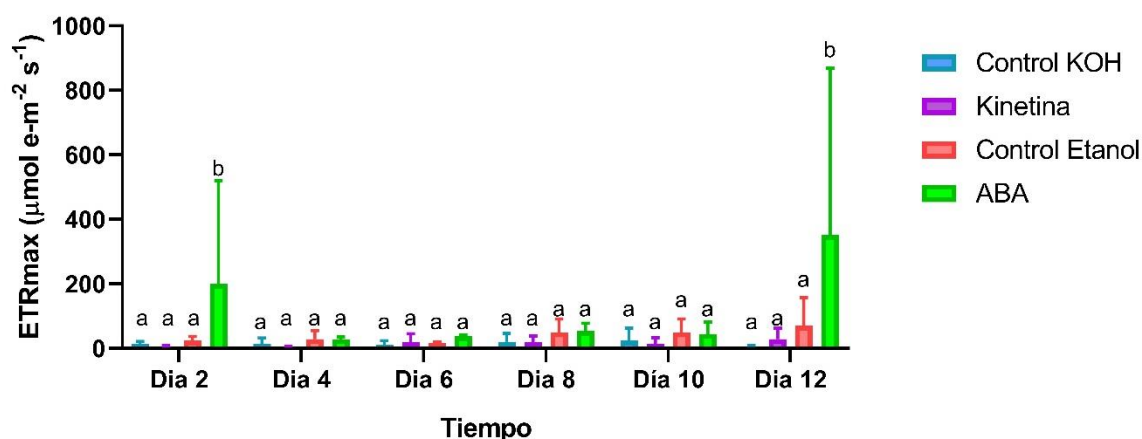


Figura 5: Tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{máx}) en los distintos tratamientos experimentales medidos cada dos días en el tiempo de cultivo de la cepa CCM-UdeC 264

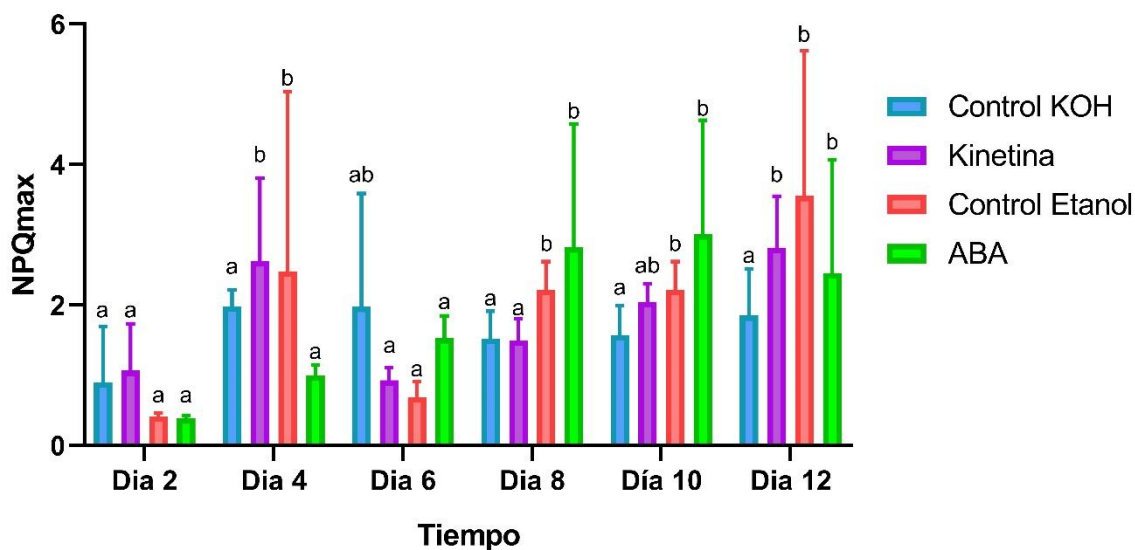


Figura 6: Rendimiento no fotoquímico máximo (NPQmax) en los distintos tratamientos experimentales medidos cada dos días en el tiempo de cultivo de la cepa CCM-UdeC 264.

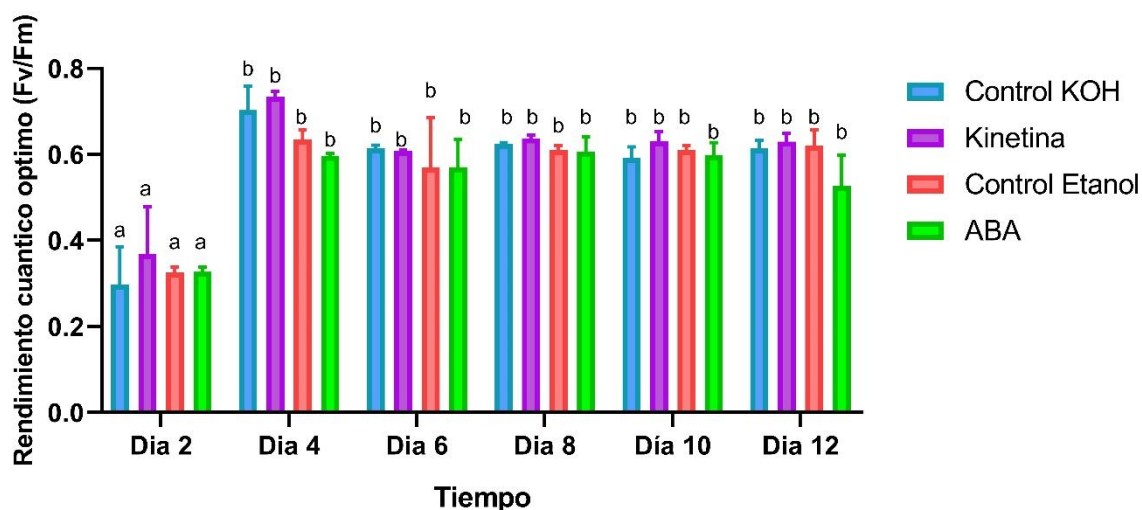


Figura 7: Rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) en los distintos tratamientos experimentales medidos cada dos días en el tiempo de cultivo de la cepa CCM-UdeC 264.

Análisis bioquímicos:

a) Contenido de lípidos totales

En la Figura 8 se puede observar el contenido de lípidos totales en los diferentes tratamientos a los que la cepa fue expuesta. Los gráficos se expresaron en relación a la biomasa seca (%), por volumen de los cultivos ($\mu\text{g ml}^{-1}$) y por célula (pg cel^{-1}).

Expresado como porcentaje de lípidos por biomasa seca, kinetina disminuyó el contenido de lípidos (Fig 8a) y expresado por volumen de cultivo, ABA disminuyó la producción de lípidos en los cultivos (Fig 8b). Finalmente, expresado como contenido de lípidos por célula (Fig.8.c) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

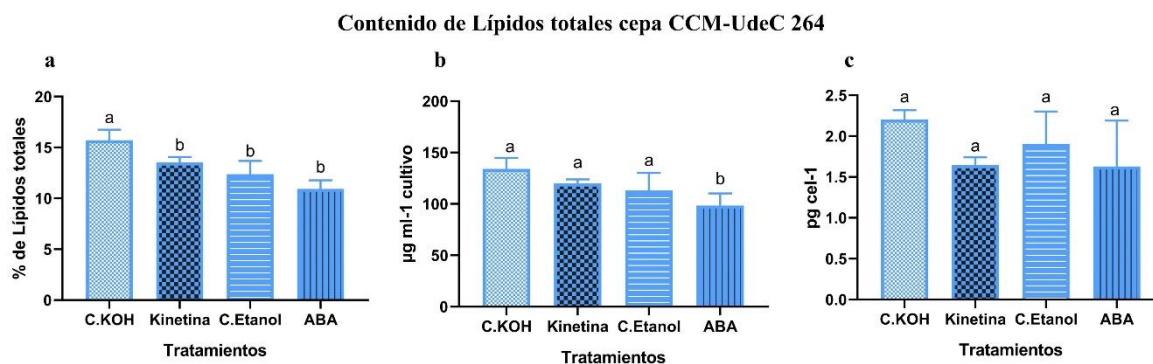


Figura 8: Composición lipídica de la cepa CCM-UdeC 264. **a.** Contenido de lípidos por biomasa seca (%). **b.** Lípidos por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). **c.** Lípidos por célula (pg cel^{-1}). Superíndices con igual letra indica que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

b) Perfil de ácidos grasos:

En la Tabla 3 se puede observar el perfil de ácidos grasos en los distintos tratamientos sometidos a experimentación. Según los análisis estadísticos empleados, se logró evidenciar que los cultivos tratados con ABA disminuyeron el contenido de los siguientes ácidos grasos: ácido láurico, pentadecanoico, mirístico, palmítico, oleico y palmitoleico.

Por otro lado, el contenido del ácido linoleico en los cultivos experimentales fue mayor en los cultivos expuestos a kinetina según el porcentaje con respecto a los ácidos grasos totales. Los cultivos tratados con ácido abscísico (ABA) generaron aumentos significativos en el porcentaje de ácido Arachidonico. Entre las fitohormonas mencionadas se observaron diferencias con respecto al contenido de ácido docosahexaenoico (DHA), donde a pesar de no encontrar diferencias significativas con sus respectivos controles, los cultivos expuestos a ABA presentaron mayor contenido de DHA que los cultivos con kinetina.

En la Figura 9 se puede observar de forma gráfica las diferencias entre los tratamientos con respecto al contenido del ácido graso: ácido eicosapentaenoico (EPA). El grafico que resume el porcentaje de EPA con respecto a los ácidos grasos totales (Fig. 9a) no muestra diferencias significativas entre los tratamientos experimentales, en general los porcentajes alcanzados rondaron entre 23-25% de EPA.

Por otro lado, el contenido de EPA expresados en mg/g de biomasa seca (Fig. 9b) muestra diferencias significativas con los cultivos expuestos a ácido abscísico (ABA), donde se puede observar un contenido de EPA significativamente menor en comparación con el resto de los tratamientos. En general la adición de kinetina no influyo en el contenido de EPA.

Contenido de EPA cepa CCM-UdeC 264

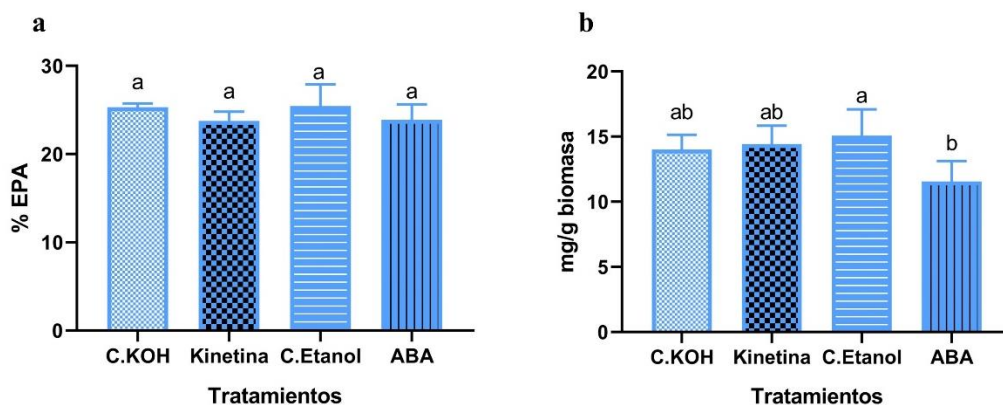


Figura 9: Contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la cepa CCM-UdeC 264, especie: *Phaeodactylum tricornotum*. **a.** Proporción de EPA (%) con respecto a los ácidos grasos totales **b.** Contenido de EPA por biomasa seca (mg/g). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

Tabla 3: Análisis de ácidos grasos presentes en la biomasa de cepa CCM-UdeC 264. Los valores son expresados como promedio \pm desviación estándar. Para cada tratamiento realizado se obtuvieron valores expresados como mg/g por biomasa seca y % de cada ácido graso con respecto a los ácidos grasos totales. Letras distintas en los superíndices indican diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

| Ácidos Grasos | | Control KOH | | Kinetina | | Control Etanol | | ABA | |
|------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | mg/g | % | mg/g | % | mg/g | % | mg/g | % |
| Saturados | | | | | | | | | |
| C12:0 | Laurico | 0,47 \pm 0,07 ^a | 0,84 \pm 0,09 ^a | 0,33 \pm 0,03 ^{ab} | 0,54 \pm 0,08 ^b | 0,35 \pm 0,12 ^{ab} | 0,59 \pm 0,20 ^a | 0,23 \pm 0,07 ^b | 0,47 \pm 0,14 ^b |
| C14:0 | Mirístico | 4,89 \pm 0,39 ^a | 8,84 \pm 0,38 ^a | 5,23 \pm 0,34 ^a | 8,63 \pm 0,38 ^a | 4,86 \pm 0,35 ^{ab} | 8,23 \pm 0,43 ^a | 4,14 \pm 0,32 ^b | 8,58 \pm 0,22 ^a |
| C16:0 | Palmitico | 10,14 \pm 1,00 ^{ab} | 18,30 \pm 0,35 ^a | 11,80 \pm 0,98 ^a | 19,44 \pm 0,56 ^a | 10,97 \pm 0,90 ^{ab} | 18,59 \pm 1,42 ^a | 9,67 \pm 0,73 ^b | 20,04 \pm 0,95 ^a |
| C18:0 | Estearico | 0,09 \pm 0,01 ^a | 0,17 \pm 0,01 ^a | 0,10 \pm 0,01 ^a | 0,17 \pm 0,03 ^a | 0,10 \pm 0,01 ^a | 0,18 \pm 0,02 ^{ab} | 0,11 \pm 0,03 ^a | 0,22 \pm 0,04 ^b |
| C15:0 | Pentadecanoico | 0,14 \pm 0,01 ^{ab} | 0,26 \pm 0,01 ^a | 0,14 \pm 0,02 ^{ab} | 0,24 \pm 0,01 ^a | 0,18 \pm 0,08 ^a | 0,30 \pm 0,10 ^a | 0,12 \pm 0,01 ^b | 0,24 \pm 0,01 ^a |
| Total Saturados | | 15,73 \pm 1,49 ^a | 28,41 \pm 0,84 ^a | 17,61 \pm 1,37 ^a | 29,03 \pm 1,06 ^a | 16,47 \pm 1,46 ^a | 27,89 \pm 2,18 ^a | 14,26 \pm 1,16 ^a | 29,56 \pm 1,37 ^a |
| Monoinsaturados | | | | | | | | | |
| C16:1 | Palmitoleico | 20,12 \pm 1,85 ^{ab} | 36,33 \pm 0,49 ^a | 22,56 \pm 2,02 ^a | 37,14 \pm 0,66 ^a | 21,43 \pm 2,06 ^a | 36,20 \pm 1,14 ^a | 17,21 \pm 0,96 ^b | 35,69 \pm 1,31 ^a |

| | | | | | | | | | |
|------------------------------|--|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| C18:1 n9c | Oleico | 1,30 ± 0,13 ^a | 2,35 ± 0,08 ^a | 1,42 ± 0,19 ^a | 2,34 ± 0,17 ^{ab} | 1,17 ± 0,05 ^{ab} | 1,99 ± 0,09 ^b | 1,02 ± 0,09 ^b | 2,13 ± 0,17 ^{ab} |
| Total Monoinsaturados | | 21,42 ± 1,98 ^a | 38,68 ± 0,57 ^a | 23,98 ± 2,20 ^a | 39,48 ± 0,84 ^a | 22,60 ± 2,11 ^a | 38,19 ± 1,24 ^a | 18,23 ± 1,05 ^a | 37,81 ± 1,48 ^a |
| Poliinsaturados | | | | | | | | | |
| C18:2 n6c | Linoleico | 1,79 ± 0,24 ^a | 3,22 ± 0,17 ^b | 2,17 ± 0,21 ^{ab} | 3,58 ± 0,17 ^c | 2,35 ± 0,20 ^b | 3,97 ± 0,08 ^a | 1,79 ± 0,17 ^a | 3,71 ± 0,15 ^{ac} |
| C18:3 n6 | gama-linolenico | 0,23 ± 0,03 ^a | 0,42 ± 0,02 ^a | 0,27 ± 0,02 ^a | 0,44 ± 0,04 ^{ab} | 0,26 ± 0,03 ^a | 0,44 ± 0,09 ^{ab} | 0,26 ± 0,03 ^a | 0,53 ± 0,02 ^b |
| C18:3 n3 | alfa-linolenico | 0,28 ± 0,04 ^{ab} | 0,50 ± 0,04 ^{ab} | 0,33 ± 0,08 ^a | 0,54 ± 0,11 ^{ab} | 0,33 ± 0,08 ^a | 0,56 ± 0,10 ^a | 0,19 ± 0,04 ^b | 0,38 ± 0,07 ^b |
| C20:3 n6 | cis-8,11,14-Eicosatrienoico | 0,06 ± 0,01 ^a | 0,11 ± 0,01 ^a | 0,05 ± 0,01 ^a | 0,09 ± 0,01 ^a | 0,05 ± 0,02 ^a | 0,09 ± 0,03 ^a | 0,05 ± 0,01 ^a | 0,11 ± 0,01 ^a |
| C20:4 n6 | Arachidonico | 1,58 ± 0,13 ^a | 2,85 ± 0,07 ^a | 1,56 ± 0,12 ^a | 2,56 ± 0,09 ^a | 1,68 ± 0,11 ^a | 2,86 ± 0,32 ^a | 1,64 ± 0,22 ^a | 3,38 ± 0,23 ^b |
| C20:5 n3 | cis-5,8,11,14,17- Eicosapentaenoico | 14,01 ± 1,14 ^{ab} | 25,32 ± 0,41 ^a | 14,43 ± 1,41 ^{ab} | 23,75 ± 1,05 ^a | 15,07 ± 2,02 ^a | 25,45 ± 2,46 ^a | 11,56 ± 1,56 ^b | 23,88 ± 1,77 ^a |
| C22:6 n3 | cis-4,7,10,13,16,16- Docosahexaenoico | 0,27 ± 0,04 ^a | 0,49 ± 0,03 ^a | 0,32 ± 0,05 ^a | 0,53 ± 0,07 ^{ab} | 0,33 ± 0,05 ^a | 0,56 ± 0,08 ^{ab} | 0,31 ± 0,05 ^a | 0,64 ± 0,06 ^b |
| Total Poliinsaturados | | 18,22 ± 1,63 ^a | 32,91 ± 0,74 ^a | 19,13 ± 1,92 ^a | 31,49 ± 1,54 ^a | 20,08 ± 2,50 ^a | 33,93 ± 3,15 ^a | 15,79 ± 2,08 ^a | 32,63 ± 2,31 ^a |

c) Proteínas totales

La Figura 10 muestra el contenido de proteínas en los tratamientos experimentales expresados según biomasa seca (%), por volumen de los cultivos ($\mu\text{g ml}^{-1}$), y por célula (pg cel^{-1}).

No se evidenciaron efectos de las fitohormonas en la acumulación de proteínas ya que, en ambos casos, los tratamientos hormonales no tuvieron diferencias respecto a sus respectivos controles. Sin embargo, se observó un probable efecto del solvente usado para disolver las hormonas, ya que los cultivos tratados con etanol como solvente disminuyeron su contenido de proteínas respecto a los tratados con KOH.

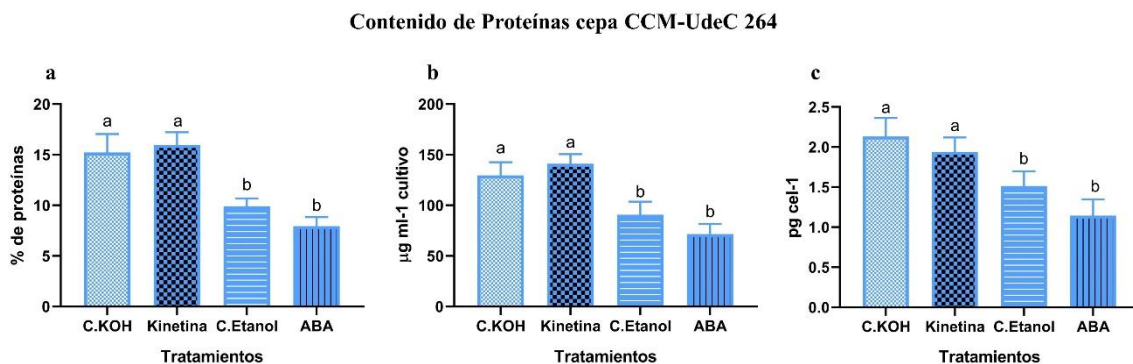


Figura 10: Contenido de proteínas totales en cepa CCM-UdeC 264. **a.** Contenido de proteínas extraídas de biomasa seca (%). **b.** Contenido de proteínas por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). **c.** Contenido de proteínas por célula (pg cel^{-1}). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

d) Carbohidratos totales

La Figura 11 muestra el contenido de carbohidratos presentes en los cultivos de *P. tricornutum*. La Figura 11.a representa el porcentaje de carbohidratos totales presentes en la biomasa seca extraída de los cultivos. El ABA, a diferencia de la kinetina, incrementó el contenido de carbohidratos ya que su valor fue significativamente mayor que el su control cuando se expresó como % por biomasa seca (Fig. 11a). Los gráficos expresados como

contenido de carbohidratos por volumen de cultivo y por célula (Fig. 11b y c) no evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

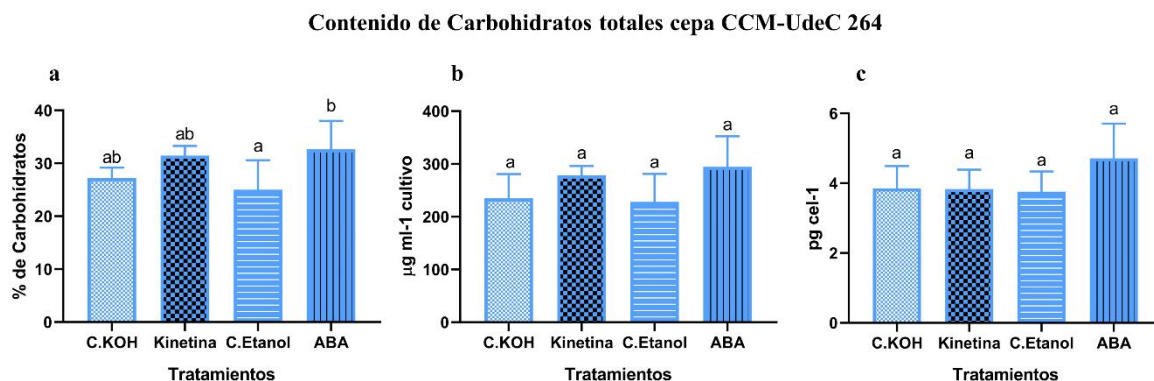


Figura 11: Contenido de carbohidratos totales en cepa CCM-UdeC 264. **a.** Contenido de carbohidratos extraídos de biomasa seca (%). **b.** Carbohidratos por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). **c.** Carbohidratos por célula (pg cel^{-1}). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

e) Fenoles totales

Se puede observar el contenido de fenoles totales en los cultivos tratados experimentalmente de manera grafica en la Figura 12 con sus respectivas diferencias significativas y expresado como contenido de fenoles por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Los datos obtenidos mediante los análisis estadísticos evidenciaron que el ABA disminuyó el contenido de fenoles totales en el cultivo respecto a su control; por otro lado, la hormona Kinetina no afectó significativamente este parámetro (Fig.12)

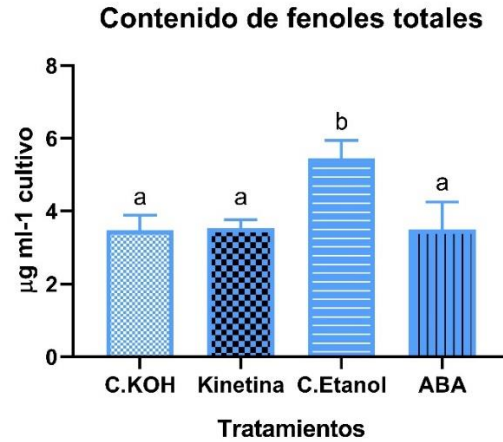


Figura 12: Contenido de fenoles totales en cepa CCM-UdeC 264. Expresado como fenoles por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

f) Contenido de clorofilas y carotenoides totales:

Se graficó el contenido de clorofila *a*, clorofila c_1+c_2 y carotenoides totales en los distintos tratamientos se expresaron los resultados por volumen de los cultivos ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Los datos obtenidos mediante los análisis estadísticos efectuados evidenciaron un menor contenido de clorofila *a* en los cultivos tratados con ABA; por otro lado, los cultivos expuestos a kinetina no mostraron diferencias significativas con su respectivo control (Fig.13).

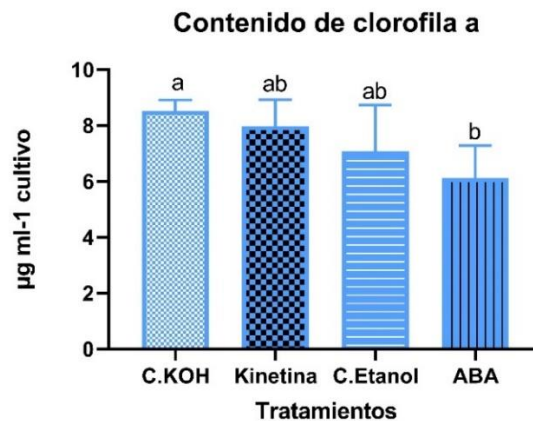


Figura 13: Contenido de clorofila a en la cepa CCM-UdeC 264. Expresado como Clorofila a por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

En el caso del contenido de clorofila c1+c2 en los cultivos (Fig.14). se registró la misma tendencia observada con el contenido de clorofila a, es decir, sin significancia entre los tratamientos evaluados con kinetina, y un menor contenido de clorofila c en los cultivos expuestos a ácido abscísico.

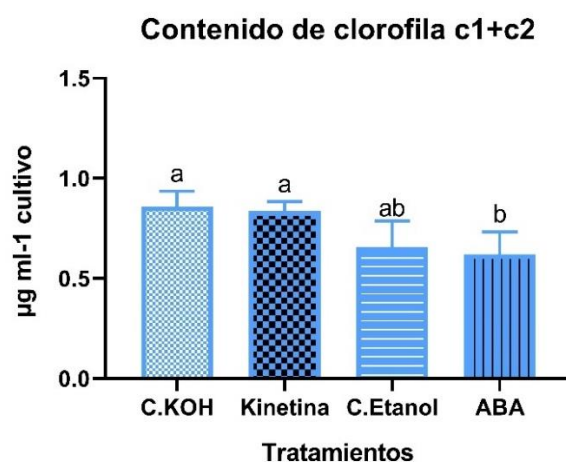


Figura 14: Contenido de clorofila c en la cepa CCM-UdeC 264. Expresado como Clorofila c por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan la media \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

La Figura 15 muestra como el contenido de carotenoides en los tratamientos evaluados no presentaron diferencias significativas, en general los datos de los controles y sus respectivas fitohormonas rondaron los 4-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo.

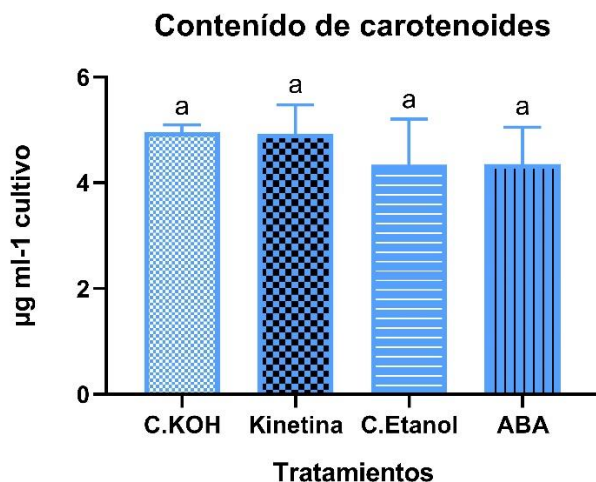


Figura 15: Contenido de carotenoides totales en la cepa CCM-UdeC 264. Expresado como carotenoides por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

Dentro del amplio espectro de los análisis realizados para clorofilas y carotenoides, se analizó también, el contenido de fucoxantina graficado en la Figura 16. Similar a lo obtenido para carotenoides totales, no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos.

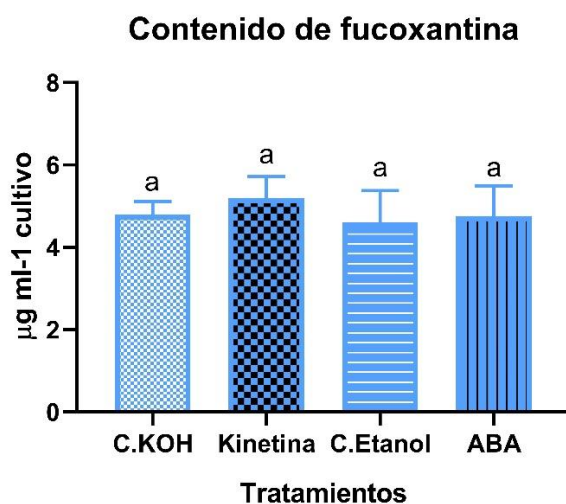


Figura 16: Contenido de fucoxantina en la cepa CCM-UdeC 264. Expresado como fucoxantina por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). Superíndices con igual letra demuestra que no

se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de cuatro replicas en cada tratamiento.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto de fitohormonas en el crecimiento y acumulación de distintos metabolitos de importancia biotecnológica en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*

La evaluación preliminar nos entregó información con respecto a la fitohormona (y su concentración) que podría estimular el crecimiento de la cepa en estudio (Fig.1). La hormona seleccionada fue kinetina a la concentración más baja evaluada: 0.5 ppm (partes por millón). Esta fitohormona ha sido previamente evaluada en diferentes especies de microalgas donde ha evidenciado estimular el crecimiento por ejemplo en la microalga *Nannochloropsis oceánica* (Eustigmatophyceae) descrito por Udayan y colaboradores (2018), en donde se documentó una alta densidad celular con concentraciones de kinetina aún más bajas a las utilizadas en este estudio (0.215ppm). A pesar de que las concentraciones bajas de kinetina incrementaron la proliferación celular en el estudio de Udayan y colaboradores (2018) la producción de biomasa (peso seco) no fue correlacionada con la densidad; situación que de igual manera se presentó en nuestra investigación (Tabla 2).

Dado que las microalgas comparten una relación fisiológica con las plantas superiores, el incremento en el crecimiento en concentraciones bajas de kinetina puede ser relacionado con la activación de reguladores del ciclo celular y la diferenciación, pudiendo ser un mecanismo propuesto detrás del aumento en la proliferación celular en plantas superiores (Sheen 2001). A pesar de la existencia de esta hipótesis, el mecanismo no está claramente estudiado en microalgas, por lo que es necesaria la investigación de esa área para esclarecerlo (Udayan et al., 2018).

Con respecto a los cultivos tratados con ácido abscísico (ABA) los resultados no mostraron cambios en el crecimiento (Fig.4) lo cual concuerda con varios estudios que reportan que al aplicar ácido abscísico en la fase estacionaria temprana no se inhibiría el crecimiento de la especie. Así, por ejemplo, Zhang y colaboradores (2021) generaron cultivos expuestos a diferentes concentraciones de ABA en *P. tricornutum* incluyendo la concentración utilizada en este estudio cuyos resultados concuerdan con que el crecimiento de un cultivo no es afectado al ser aplicada en esta etapa experimental.

El indicador fotobiológico Fv/Fm corresponde a la máxima eficiencia fotoquímica de los centros de reacción asociados al fotosistema II, permitiendo ser carácter que refleja la eficiencia de este fotosistema en los procesos dependientes de luz (Chu et al., 2019). En general, los factores en el ambiente (temperatura, irradiancia, etc) y patrones endógenos (composición genética, estado fisiológico, etc) pueden afectar esta eficiencia fotoquímica (Cosgrove y Borowitzk, 2011). En esta investigación los factores abióticos que se estudiaron sobre el rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) fue la presencia de fitohormonas; que en cuyo caso no influyeron negativamente sobre la actividad fotosintética de *P.tricornutum*, obteniendo valores superiores a 0,5 (de 4 a 12 días), lo cual indica un estado fisiológico de fotosaturación y nula o baja fotoinhibición; mientras que en los inicios de los cultivos se observó una tendencia de aclimatación de la cepa con valores inferiores (Fig. 7). Lo anterior, concuerda con la investigación realizada por Chu y colaboradores (2019) quienes obtuvieron una actividad similar en *P. tricornutum* expuesta a una de las hormonas analizadas (ABA)

La tasa de transporte de electrones (ETRmax) mostro aumentos en cultivos expuestos a ABA al inicio y final del crecimiento (Fig. 5), lo cual muestra una tasa de gradiente de electrones mayor bajo la influencia de esta hormona en dichos tiempos experimentales, sugiriendo una alta actividad electroquímica asociado a la cadena de transportes de electrones del fotosistema II. Nuestros hallazgos coinciden con investigaciones previas sobre los efectos del ácido abscísico (ABA) en cultivos de microalgas. Por ejemplo, un estudio realizado por Lv y colaboradores (2019) quienes exploraron los efectos del ABA en la especie *Dunaliella salina*. En su investigación, observaron que la aplicación de ABA resultó en una capacidad alta de fijación de carbono en ciertos días del experimento, consecuente de una mayor tasa de gradiente de electrones.

Por otro lado, el parámetro de rendimiento no fotoquímico (NPQ) no mostró una tendencia clara de variación en los distintos tratamientos. Kinetina, mejoro en ciertos tiempos la capacidad no fotoquímica reduciendo el daño lumínico en comparación con su respectivo control y ABA (Fig. 6). En general el grupo de las citoquinas han sido ampliamente reconocidas por su capacidad de fotoprotección como lo es la disipación en forma de calor y el mejoramiento de la actividad fotosintéticas en microalgas (Romanenko et al., 2016). A pesar de que este efecto no fue detectado claramente; a su vez, es posible observar que la

presencia de Kinetina eleva los niveles de NPQ, sugiriendo un posible mecanismo de protección anti-estrés desde el día 6 hasta el 12. Esto es posible correlacionarlo con el aumento de la concentración de carotenoides totales, quienes poseen la capacidad de disipación de calor mediante el ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams & Adams, 2002).

El contenido de lípidos reveló una disminución con respecto al porcentaje de lípidos en la adición de kinetina y ABA en los datos expresados como mg/g de biomasa seca. Así, por ejemplo, Sulochana y colaboradores (2016) mostraron resultados similares, donde la adición de ácido abscísico en medios de cultivos afines al usado en nuestro estudio, pero en la especie *Scenedesmus quadricauda* no incrementa el contenido de este metabolito primario, sino que incluso puede disminuirlo. Siendo en *P. tricornutum* la misma tendencia bajo la adición individual de ABA revelada por Chu y colaboradores (2019), quienes sugieren que las combinaciones de fitohormonas podrían incrementar de mayor manera el contenido de lípidos.

El contenido de ácidos grasos presento un incremento en varios grupos poliinsaturados bajo la adición de fitohormonas, pero no se produjo una significancia notoria con respecto al total del perfil de ácidos grasos analizados. A pesar de lo anterior, el contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) no tuvo variaciones significativas en los tratamientos control y kinetina; mientras que bajo la exposición de ABA el contenido de EPA mostro una disminución; esto concuerda con el estudio realizado por Fierli y colaboradores (2022), quienes obtuvieron resultados similares, con respecto a un menor contenido de EPA de *P. tricornutum* con concentraciones de 1.5 ppm de ácido abscísico. Estudios de microalgas expuestas a kinetina han revelado resultados bastante similares con respecto a la baja intervención de la hormona en la producción de ácidos grasos, por ejemplo, Park y colaboradores (2013) revelaron que la adición de kinetina en diversas concentraciones no afectaban la acumulación de ácidos grasos en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, situación que fue repetida en la especie estudiada en esta investigación.

Los contenidos de clorofilas y junto con fenoles mostraron variaciones con los tratamientos fitohormonales, evidenciando menores contenidos bajo la exposición de ABA. Fierli y colaboradores (2023) revelaron que la adición de ABA en *P. tricornutum* no incrementa el contenido de clorofilas con respecto a los controles con etanol, situación que fue repetida y

corroborada en nuestra investigación. Por otro lado, los compuestos fenólicos presentes en microalgas se asocian con sus propiedades antioxidantes, desempeñando un papel importante en el crecimiento, la reproducción y la protección contra diversas condiciones de estrés. En general, los fenoles pueden acumularse en respuesta al estrés oxidativo (Cichoński & Chrzanowski, 2022); la exposición a ABA reveló un contenido reducido de fenoles, lo cual podría indicar que la cepa estaría experimentando un nivel menor de estrés oxidativo bajo estas condiciones. Con respecto al contenido de carotenoides, incluyendo a fucoxantina; no se mostraron tendencias significativas en la adición de fitohormonas; esto fue congruente con los resultados del estudio realizado por Fierli y colaboradores (2022) con respecto a la exposición de *P. tricornutum* a ácido abscísico, que no promovieron la acumulación de carotenoides, incluyendo fucoxantina en concentraciones similares de hormona (1.5ppm).

En general, las fitohormonas del grupo de las citoquininas como lo es kinetina han sido reconocidas en promover la producción de proteínas, como se describió en estudio de Piotrowska y colaboradores (2009) quienes utilizaron esta hormona en la especie *Chlorella vulgaris* obteniendo incrementos en dicho metabolito primario. En este estudio el contenido de proteínas no fue mayor a lo de su respectivo control, pero sí mayor en comparación con la otra hormona en estudio (ABA). El hecho de utilizar diferentes especies y diferentes condiciones de cultivo (temperatura, irradiación y medios de cultivo) podrían explicar dichos resultados. De igual manera, en la investigación de Fierli y colaboradores (2023) observaron que la adición de ABA no incrementó la producción de proteínas con respecto a su correspondiente control en *P. tricornutum* con concentraciones similares de la hormona que se utilizaron en nuestro estudio y sugirieron que la combinación con otra fitohormona sumada a ABA podría generar resultados más satisfactorios.

Por otro lado, el contenido de carbohidratos totales expresado por peso seco (%) presentó un incremento en los cultivos expuestos a ácido abscísico en comparación con el resto de los tratamientos analizados (Fig.11), estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Ghasemi (2021), quien utilizó concentraciones superiores de dicha fitohormona en la especie *Dunaliella salina*, y observó un incremento en la producción de hidratos de carbono. En *P. tricornutum* específicamente nuestro estudio demostró un aumento de carbohidratos en comparación con Zhang y colaboradores (2021) quienes revelaron disminuciones en el

contenido de estos. Las diferencias propias entre cepas y medios de cultivo podrían explicar estas comparaciones.

CONCLUSIONES

1. La fitohormona kinetina a una concentración de 0.5 ppm incrementó significativamente la densidad celular máxima a la que llega un cultivo de la cepa CCM-UdeC 264, pero no su tasa de crecimiento.
2. El rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) no presentó tendencias con diferencias significativas bajo la influencia de fitohormonas. La tasa de transporte de electrones (ETRmax) fue mejorada al principio y final de los cultivos bajo la influencia de ABA. Mientras que el rendimiento no fotoquímico (NPQ) no reveló tendencias significativamente claras.
3. Los lípidos totales disminuyeron en presencia de kinetina (expresados como % de lípidos por biomasa seca) y ABA (expresados por volumen de cultivo) mientras que el ABA disminuyó el contenido de EPA en la biomasa (expresado como mg de EPA/g de biomasa seca).
4. Los tratamientos con las hormonas no afectaron el contenido de proteínas, carotenoides totales ni fucoxantina; mientras que el ABA incrementó el contenido de carbohidratos y disminuyó el contenido de fenoles totales y clorofilas (a y c).
5. Los tratamientos con las hormonas kinetina y ABA, en las condiciones evaluadas no afectan significativamente el crecimiento y la acumulación de metabolitos de interés comercial en la cepa chilena de *P. tricornutum* estudiada.

BIBLIOGRAFIA

Babu, A. G., Wu, X., Kabra, A. N., & Kim, D. P. (2017). Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. *Algal research*, 23, 178-185.

Butler, T., Kapoore, R. V., & Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricorutum*: a diatom cell factory. *Trends in biotechnology*, 38(6), 606-622.

Caballero, M. A., Jallet, D., Shi, L., Rithner, C., Zhang, Y., & Peers, G. (2016). Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal research*, 20, 180-188.

Celi, C., Fino, D., & Savorani, F. (2022). *Phaeodactylum tricorutum* as a source of value-added products: A review on recent developments in cultivation and extraction technologies. *Bioresource Technology Reports*, 101122.

Castro-Varela, P.A., Celis-Plá, P.S.M., Abdala-Díaz, R. and Figueroa, F.L. (2021), Photobiological Effects on Biochemical Composition in *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta) with a Biotechnological Application. *Photochem Photobiol*, 97: 1032-1042.

Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A. *et al.* (2017) Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnol Biofuels* **10**, 60.

Chu, J., Li, Y., Cui, Y. *et al.* (2019). The influences of phytohormones on triacylglycerol accumulation in an oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J Appl Phycol* **31**, 1009–1019.

Demmig-Adams, B., & Adams III, W. W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298(5601), 2149-2153.

Eilers, P. H. C. and J. C. H. Peeters (1988) A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol. Modell.* 42, 199–215.

Fierli, D., Aranyos, A., Barone, M.E. *et al.* (2022). Influence of exogenous phytohormone supplementation on the pigment and fatty acid content of three marine diatoms. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**, 6195–6207.

Fierli, D., Barone, M. E., Mc Donnell, A., Conlon, T., & Touzet, N. (2023). Combined application of exogenous phytohormones and blue light illumination to the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal Research*, 71, 103052.

Figuroa, F. L., R. Conde-A´lvarez and I. Go´mez (2003) Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynth. Res.* 75, 259–275.

G´omez-Loredo, A., Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2015). Purification and formulation of xanthophyll for pharmaceutical use: Current strategies and future trends. *ChemBioEng Reviews*, 2(6), 393-405.

Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., & Yan, Y. (2018). Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review. *Fermentation*, 4(2), 25.

Haro, P., Sáez, K., & Gómez, P. I. (2017). Physiological plasticity of a Chilean strain of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: the effect of culture conditions on the quantity and quality of lipid production. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2771-2782.

Hockin, N. L., Mock, T., Mulholland, F., Kopriva, S., & Malin, G. (2012). The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant physiology*, 158(1), 299-312.

Jäger, K., Bartók, T., Ördög, V., & Barnabás, B. (2010). Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *South African Journal of Botany*, 76(3), 511-516.

Jallet, D., Caballero, M. A., Gallina, A. A., Youngblood, M., & Peers, G. (2016). Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*, 18, 51-60.

Jesionowska, M., Ovadia, J., Hockemeyer, K., Clews, A. C., & Xu, Y. (2023). EPA and DHA in microalgae: Health benefits, biosynthesis, and metabolic engineering advances. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.

Jusoh, M., Loh, S. H., Aziz, A., & Cha, T. S. (2019). Gibberellin promotes cell growth and induces changes in fatty acid biosynthesis and upregulates fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* UMT-M1. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188, 450-459.

Kim, S. M., Jung, Y. J., Kwon, O. N., Cha, K. H., Um, B. H., Chung, D., & Pan, C. H. (2012). A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, *166*, 1843-1855.

KOOISTRA, W. H., Gersonde, R., Medlin, L. K., & Mann, D. G. (2007). The origin and evolution of the diatoms: their adaptation to a planktonic existence. *Evolution of primary producers in the sea*, 207-249.

Lum, K. K., Kim, J., & Lei, X. G. (2013). Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *Journal of animal science and biotechnology*, *4*, 1-7.

Lu, Y., & Xu, J. (2015). Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends in plant science*, *20*(5), 273-282.

Lv, H., Wang, Q. E., Wang, S., Qi, B., He, J., & Jia, S. (2019). Enhancing biomass production of *Dunaliella salina* via optimized combinational application of phytohormones. *Aquaculture*, *503*, 146-155.

Madani, N. S. H., Shamsaie Mehrgan, M., Hosseini Shekarabi, S. P., & Pourang, N. (2021). Regulatory effect of gibberellic acid (GA3) on the biomass productivity and some metabolites of a marine microalga, *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*, *33*, 255-262.

M. Hayes, H. Skomedal, K. Skjånes, H. Mazur-Marzec, A. Toruńska-Sitarz, M. Catala, M. Isleten Hosoglu, M. García-Vaquero, Microalgal proteins for feed, food and health, In Woodhead Publishing Series in Energy, Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts, Woodhead Publishing, 2017, Pages 347-368.

Moon, M., Park, W. K., Suh, W. I., Chang, Y. K., & Lee, B. (2019). Biological carbon recovery from sugar refinery washing water into microalgal DHA: medium optimization and stress induction. *Scientific Reports*, *9*(1), 19959.

Mousavi, P., Morowvat, M. H., Montazeri-Najafabady, N., Abolhassanzadeh, Z., Mohagheghzadeh, A., Hamidi, M., ... & Ghasemi, Y. (2016). Investigating the effects of phytohormones on growth and β -carotene production in a naturally isolates stain of *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(8), 164-171.

Not, F., Siano, R., Kooistra, W. H., Simon, N., Vaultot, D., & Probert, I. (2012). Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. In *Advances in botanical research* (Vol. 64, pp. 1-53). Academic Press.

Park, W. K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C. W., Choi, Y. E., & Yang, J. W. (2013). Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 1128-1142.

Peng, J., Yuan, J. P., Wu, C. F., & Wang, J. H. (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine drugs*, 9(10), 1806-1828.

Pereira, H., Sá, M., Maia, I., Rodrigues, A., Teles, I., Wijffels, R. H., ... & Barbosa, M. (2021). Fucoxanthin production from *Tisochrysis lutea* and *Phaeodactylum tricornutum* at industrial scale. *Algal Research*, 56, 102322.

Piotrowska, A., Czerpak, R. (2009). Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine- and phenylurea-type cytokinins. *Acta Physiol Plant* 31, 573–585.

Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E., & Godlewska-Żyłkiewicz, B. (2012). Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 52-65.

Raposo, M., De Morais, R., & Bernardo de Morais, A. (2013). Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233–252. MDPI AG.

Renuka, N., Guldhe, A., Singh, P., Ansari, F. A., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Evaluating the potential of cytokinins for biomass and lipid enhancement in microalga *Acutodesmus obliquus* under nitrogen stress. *Energy Conversion and Management*, 140, 14-23.

Romanenko, K. O., Kosakovskaya, I. V., & Romanenko, P. O. (2016). Phytohormones of microalgae: Biological role and involvement in the regulation of physiological processes. *International Journal on Algae*, 18(2).

Qi, M., Yao, C., Sun, B. *et al.* (2019). Application of an-in situ CO₂–bicarbonate system under nitrogen depletion to improve photosynthetic biomass and starch production and regulate amylose accumulation in a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Biotechnol Biofuels* 12, 184.

Sheen, J. (2001). Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, 127(4), 1466-1475.

Shah, S., Li, X., Jiang, Z., Fahad, S., & Hassan, S. (2022). Exploration of the phytohormone regulation of energy storage compound accumulation in microalgae. *Food and Energy Security*, 11(4), e418.

Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553.

Sirisuk, P., Sunwoo, I., Kim, S. H., Awah, C. C., Ra, C. H., Kim, J. M., ... & Kim, S. K. (2018). Enhancement of biomass, lipids, and polyunsaturated fatty acid (PUFA) production in *Nannochloropsis oceanica* with a combination of single wavelength light emitting diodes (LEDs) and low temperature in a three-phase culture system. *Bioresource technology*, 270, 504-511.

Stirk, W. A., Ördög, V., Novák, O., Rolčík, J., Strnad, M., Bálint, P., & van Staden, J. (2013). Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains¹. *Journal of phycology*, 49(3), 459-467.

Song, Z., Lye, G. J., & Parker, B. M. (2020). Morphological and biochemical changes in *Phaeodactylum tricornutum* triggered by culture media: Implications for industrial exploitation. *Algal Research*, 47, 101822.

Sulochana, S. B., & Arumugam, M. (2016). Influence of abscisic acid on growth, biomass and lipid yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Bioresource technology*, 213, 198-203.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated.

Udayan, A., Kathiresan, S., & Arumugam, M. (2018). Kinetin and Gibberellic acid (GA3) act synergistically to produce high value polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis oceanica* CASA CC201. *Algal research*, 32, 182-192.

Udayan, A., Sabapathy, H., & Arumugam, M. (2020). Stress hormones mediated lipid accumulation and modulation of specific fatty acids in *Nannochloropsis oceanica* CASA CC201. *Bioresource Technology*, *310*, 123437.

WANG, W. J., WANG, G. C., Zhang, M., & Tseng, C. K. (2005). Isolation of fucoxanthin from the rhizoid of *Laminaria japonica* Aresch. *Journal of Integrative Plant Biology*, *47*(8), 1009-1015.

Wang, Z., Mou, J., Qin, Z., He, Y., Sun, Z., Wang, X., & Lin, C. S. K. (2022). An auxin-like supermolecule to simultaneously enhance growth and cumulative eicosapentaenoic acid production in *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresource Technology*, *345*, 126564.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, *144*(3), 307-313.

Xu, J. M., & Xiong, J. Q. (2023). Boosting the yields of microalgal biomass and high value-added products by phytohormones: A mechanistic insight using transcriptomics. *Journal of Cleaner Production*, *393*, 136175.

Yoshida, K., Igarashi, E., Mukai, M., Hirata, K., & Miyamoto, K. (2003). Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid. *Plant, Cell & Environment*, *26*(3), 451-457.

Zhang, W., Wang, F., Gao, B., Huang, L., & Zhang, C. (2018). An integrated biorefinery process: Stepwise extraction of fucoxanthin, eicosapentaenoic acid and chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricornutum* biomass. *Algal research*, *32*, 193-200.

Zhang, H., Yin, W., Ma, D. *et al.* (2021). Phytohormone supplementation significantly increases fatty acid content of *Phaeodactylum tricornutum* in two-phase culture. *J Appl Phycol* **33**, 13–23.