



Encuentro
de Jóvenes
Investigadores

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS EN TIEMPO REAL DE CULTIVOS DE *H. pluvialis*

Tacca, Agustin; Devercelli, Melina; Ibañez, Manuel

Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos - FCB - UNL

Instituto Nacional de Limnología INALI-UNL

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: propiedades ópticas, microalgas, Astaxantina.

INTRODUCCIÓN

La microalga fotosintética *H. pluvialis* es la mejor productora natural de Astaxantina, un compuesto carotenoide "super antioxidante" con elevado interés farmacéutico (Katsuda et.al., 2004; Shah et.al., 2016). Existe un creciente interés en su cultivo, pero se dificulta su estudio en todas las escalas debido a que presenta diferentes estadios de vida, asociados al estrés (Kobayashi et.al., 1997). Se destacan dos principales: un estadio vegetativo de color verde en el que las algas se encuentran reproductivamente activas, y un estadio de estructura de resistencia "cisto" con elevada acumulación de Astaxantina, que le otorga color rojo. Uno de los factores menos costosos y que más influye en la duración de dichos estadios es la luz (Park, 2001). Un estudio físico/matemático/computacional de la interacción luz-células es necesario para continuar en estas líneas de investigación. En este sentido, las propiedades ópticas, que son coeficientes numéricos que representan la interacción luz-célula en un momento particular del ciclo de vida (Ibañez et.al., 2020), constituyen un campo útil y sin antecedentes en *H. pluvialis*. Se propone el uso de estas propiedades ópticas como herramienta para establecer un balance de energía radiante, a modo de estrategia de control de la luz. De esta manera, la medición de propiedades ópticas permitiría tomar decisiones al momento de detectarse modificaciones en la intensidad de luz en el interior de un cultivo de *H. pluvialis* según el objetivo perseguido.

OBJETIVOS

- Estudiar las propiedades ópticas de cultivos a escala laboratorio de *H. pluvialis*, partiendo de un estadio vegetativo hacia un estadio final de producción de sustancias de interés industrial.
- Estudiar las propiedades ópticas de la etapa de germinación de estructuras de resistencia de *H. pluvialis* (aplanosporas) hacia la etapa reproductiva de las mismas.

Título del proyecto: EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS EN TIEMPO REAL DE CULTIVOS DE *H. pluvialis*

Instrumento: CIENTIBECA – CAPITAL SEMILLA

Año convocatoria: CIENTIBECA 2021 - CAPITAL SEMILLA 2020

Organismo financiador: UNL - UNL. CETRI Litoral.

Director: Manuel Vicente Ibañez



METODOLOGÍA

La cepa en estudio fue *H. pluvialis mex* (CCM-FAUBA, Argentina). Para este trabajo, se preparó un inóculo de acuerdo a una metodología adaptada de Aflalo et al. (2007). Primeramente, se realizaron cultivos concentrados de células vegetativas a partir de cistos de la microalga en medio BG-11 (LLavarasi et al. 2011) y en condiciones controladas ($T = 298 \text{ K}$, $\text{pH} = 7,5$, intensidad luminosa = $7,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, luz LED de tipo blanco cálido y frío) en una cámara de cultivo Demetra470L (J3Desarrollos, Mar del Plata, Argentina). Se partió de un volumen de $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ L}$ conteniendo una suspensión concentrada de cistos, y tras haber alcanzado una concentración igual a $5,0 \cdot 10^7$ células reproductivas $\cdot \text{L}^{-1}$, las células fueron cosechadas mediante centrifugación suave y resuspendidas en $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ L}$ de medio BG-11 estéril. Seguidamente se repitió el mismo procedimiento hasta obtener la misma densidad celular que antes, y se repitió el mismo procedimiento en un volumen final de $5,0 \cdot 10^{-1} \text{ L}$, para finalmente transferir dicha concentración de células reproductivas a un volumen final de 1.8 L con medio BG-11 en un biorreactor. Este biorreactor consistió en un frasco Schott con la tapa modificada para mantener un flujo de aire en condiciones de esterilidad. El cultivo fue mantenido en condiciones controladas ($T = 298 \text{ K}$, $\text{pH} = 7,5$, intensidad luminosa = $1,40 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, luz LED de tipo blanco cálido y frío). Los cultivos fueron aireados mediante una corriente de aire filtrado enriquecido a un 1.5% con CO_2 puro, con un caudal controlado mediante un caudalímetro (Nikkon, Buenos Aires) de $3,3 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Las experiencias se desarrollaron en dos etapas. La etapa 1, con una duración total de 15 días, y la etapa 2, con una duración de 3 días. En la etapa 1, se evaluó la transición de una cantidad inicial de células en estado vegetativo hacia su transformación total a cistos. En la etapa 2, contrariamente, se analizó la capacidad de reactivación de una cantidad inicial de cistos (aplanosporas) y su desarrollo hacia células en estado vegetativo. Una vez por cada día de la etapa 1, se tomó una muestra de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ L}$, la cual fue recolectada por volcado en condiciones de esterilidad. En el caso de la etapa 2, el muestreo se realizó de la misma manera pero cada 8 horas. De ese volumen, una parte se utilizó para la determinación de carotenoides y clorofilas de acuerdo a la metodología sugerida por Ritchie et al. (2006). Adicionalmente se realizaron un recuento de las poblaciones celulares de acuerdo a cada estadio, mediante recuento en cámara de Neubauer, y la determinación de propiedades ópticas de cada muestra. El dispositivo para determinación de propiedades ópticas fue construido y calibrado según se describe en Ibañez et al. (2020). En líneas generales, el dispositivo contiene una fuente de luz conectada a una fibra óptica inmóvil. El haz de luz transmitido por dicha fibra óptica se hace incidir en una cubeta ($6,0 \cdot 10^{-3} \text{ L}$). La luz que atraviesa la cubeta es recogida por una segunda fibra óptica en diferentes ángulos alrededor de la muestra, y luego es derivada a un espectrómetro que transduce la señal a intensidades de luz relativas y longitudes de onda, lo que es leído, interpretado y graficado por un programa de computadora (Spectra Gryph). Finalmente, a través de un balance de energía, se resuelve la ecuación de transferencia de energía radiante para cada experimento a través del método de Monte Carlo, y se calculan 31 valores de coeficientes de absorción y de dispersión para cada muestra, y la función de fase de dispersión de las mismas.

Además de las variables antes mencionadas, se realizó un registro fotográfico de la variación morfológica utilizando microscopios Nikon Eclipse TS1100 y Leica DM 3000 LED.

CONCLUSIONES

En la etapa 1, los coeficientes de dispersión se mantuvieron prácticamente constantes en $t=0$ d, en un promedio de $1,09 \cdot 10^{-4} \pm 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ m}^{-1}$, mientras que en $t=14$ d se registraron valores más elevados ($6,46 \cdot 10^{-4} \pm 1,43 \cdot 10^{-4} \text{ m}^{-1}$) y oscilaciones con picos notables en 540 nm y 690 nm de $8,70 \cdot 10^{-4} \text{ m}^{-1}$. La función de fase que se puede obtener con dichos coeficientes se calcula por defecto, y no tiene una utilidad directa para plantear una estrategia de control por luz en relación a las propiedades ópticas. Sin embargo, podría emplearse en una etapa posterior del análisis del comportamiento de esta especie a escalas industriales, tanto para el cálculo de la cantidad de luz absorbida por los cultivos como para la estimación de la productividad real de biomasa en cuanto a la cantidad total de energía entregada.

En relación a los perfiles de coeficientes específicos de absorción de luz (Fig. 1), obtenidos al dividir los coeficientes de absorción por la cantidad de biomasa presente en el cultivo, se observan los picos característicos en 480 nm y 680 nm correspondientes a las clorofilas a y b respectivamente para el tiempo $t=0$ d. Se observa la variación en el patrón de absorción a medida que pasa el tiempo, obteniendo valores de absorción típicos de carotenoides (460-490 nm) en tiempo $t=14$ d. Es notable cómo en la transición desde las formas vegetativas a las de estrés, se observa un incremento relativo en la absorción de luz visible verde, la cual no es fotosintéticamente útil para las células verdes. Esto último en sí mismo no es un resultado relevante en cuanto al cálculo de la cantidad de luz absorbida por los cultivos, pero puede ser un indicador potencial de

la aparición de cistos. Detectar estos cambios permitiría ejecutar decisiones respecto a las condiciones de iluminación del cultivo y evitar o promover la formación de cistos. Como la aparición de estas estructuras de resistencia se da mediante la activación de genes relacionados a la carotenogénesis (Shah et al., 2016), un ajuste de la intensidad de iluminación del cultivo permitiría controlar la producción de astaxantina por estrés oxidativo.

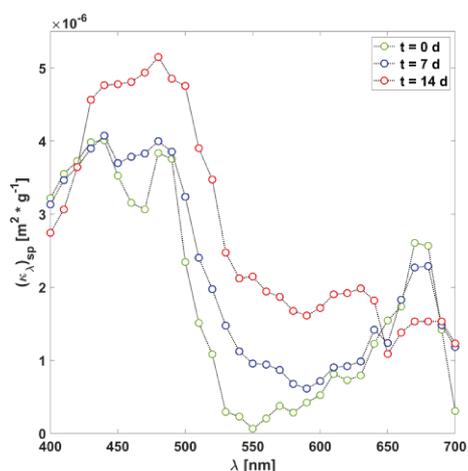
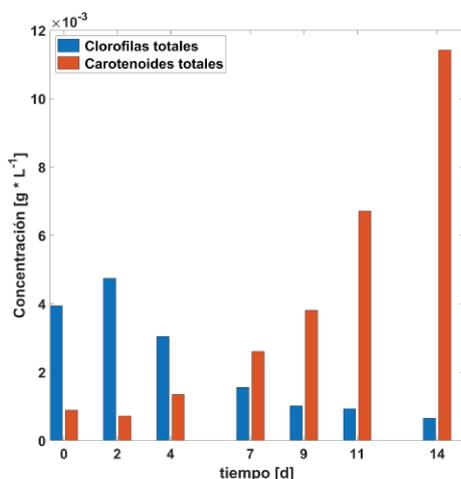


Figura 1. Evolución temporal de los coeficientes específicos de absorción de los cultivos estudiados para tres instantes en el tiempo, en los cuales mayoritariamente se observaron células móviles ($t=0$ d), verdes no móviles ($t=7$ d) y cistos ($t=14$ d).

En cuanto a la concentración de pigmentos, los resultados obtenidos son consistentes con lo esperado para el cultivo (Fig. 2). La concentración inicial de clorofilas disminuyó de una concentración inicial $3,94 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, a $6,5 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ al día 15. Por contrapartida, la concentración de carotenoides totales incrementó de $8,8 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a $1,142 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ al día 15, con aumentos significativos registrados en los días 12 y 15. Autores como Lopez et al. (2006) han reportado que en *H. pluvialis* del 75 al 80% de carotenoides corresponden a astaxantina, por lo que puede tomarse el valor obtenido como indicador de la concentración de dicho lípido. El 20% restante correspondería a su precursor inmediato, cantaxantina, y a restos de beta-caroteno.



Se puede concluir entonces que las propiedades ópticas pueden ser empleadas como herramienta estratégica de control de la luz en cultivos de *H. pluvialis*, lo que abre nuevos horizontes en técnicas de optimización para obtener astaxantina a diferentes escalas.

Figura 2. Evolución temporal de la concentración de pigmentos en los cultivos de *H. pluvialis*

Con respecto a la etapa 2, se partió de la reactivación de un cultivo de $8,0 \times 10^4$ células aplanosporas L^{-1} . Se estudiaron las propiedades ópticas correspondientes a todas las etapas y se realizó un detenido seguimiento en cuanto a las variaciones de las poblaciones celulares hasta que la totalidad de la composición del cultivo fue de células en estadio reproductivo (3 días luego de la reactivación). Los perfiles de propiedades ópticas y de concentración de pigmentos resultaron a la inversa que las tendencias presentadas en las Figuras 1 y 2 anteriormente, con la excepción de que inicialmente el cultivo tuvo una concentración de clorofilas a y b igual a $1,5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que al finalizar las 72 horas de análisis, la misma se correspondió con una concentración aproximada de $4,3 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Estos datos resultaron similares a las cantidades totales presentadas en la Figura 2. Sin embargo, el valor de la concentración de pigmentos al final de los 3 días de análisis resultó ser ligeramente superior que los valores registrados para la misma secuencia de tiempo al comienzo de la etapa 1. Esto se puede relacionar, entre otras causas, con que las células que se reactivaron ya habían sufrido un proceso de foto-adaptación previo, lo que provocó que en un lapso de tiempo similar, frente a las mismas condiciones de iluminación y de cultivo, se desarrollen más células en el mismo tiempo y con una concentración de pigmentos más elevada.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., Katoh, S. (2004).** Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*. 35 (1). 81-86. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.016
- **Shah, M.R., Liang, Y., Cheng, J.J., Daroch, M. (2016).** Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*. 7. DOI: 10.3389/fpls.2016.00531.
- **Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y. (1997).** Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84 (1). 94-97. DOI: 10.1016/S0922-338X(97)82794-8
- **Park, E.K. & Lee, C.G. (2001).** Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. *Microbiology and Biotechnology*. 11 (6). 1024-1030.
- **Ibañez, M.V., Leonardi, R.J., Heinrich, J.M., Steingroewer, J., Walther, T., Felix, K. (2020).** A rapid assessment of the radiative properties from a suspension of *Chromochloris zofingiensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 3-4. DOI: 10.1016/j.jpap.2020.100007
- **M.G.-M. López, E.D.R. Sánchez, J.C. López, F.A. Fernández, J.F. Sevilla, J. Rivas, M. Guerrero, E.M. Grima (2006).** Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors, *Journal of Biotechnology* 123, 329-342. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.11.010.