

Modelo mecanístico para el crecimiento de dinoflagelados tóxicos. Caso de *Protoceratium reticulatum*.

Francisco García*, Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, M^a Carmen Cerón, El Hassan Belarbi y Emilio Molina

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería

* fgarcia@ual.es; Tel. 950015303

Resumen

En este trabajo se presenta un modelo mecanístico para el crecimiento de dinoflagelados. El modelo puede explicar respuestas velocidad de fotosíntesis *versus* irradiancia bajo limitación simultánea del crecimiento por nitratos, fosfatos, CO₂ e irradiancia. El dinoflagelado modelo fue *Protoceratium reticulatum*, productor de yessotoxinas. Las células fueron cultivadas en T-Flask a diferentes irradiancias. El modelo simuló las siguientes variables de respuesta: concentración celular, biovolumen de la suspensión celular, concentración de macronutrientes e irradiancia promedio en el interior del cultivo.

Introducción

La importancia biotecnológica de los dinoflagelados tóxicos marinos ha sido recientemente revisada [1]. Las biotoxinas que producen estas microalgas tienen dos extraordinarios campos de aplicación: (i) en seguridad alimentaria como estándares de referencia para el desarrollo y utilización de técnicas de detección de toxicidad en alimentos procedentes del mar; y (ii) en la elaboración de nuevos fármacos con diferentes actividades. Sin embargo, el desarrollo de estas áreas de aplicación está notablemente ralentizado debido a la dificultad de obtener cantidades suficientes de éstas toxinas para llevar a cabo amplios estudios. El origen de esta dificultad parece residir en los serios obstáculos que plantea el cultivo masivo de estos microorganismos.

Muchas de las especies de interés son fotoautotróficas. Por tanto, el cultivo de éstas debe desarrollarse en fotobiorreactores. El desarrollo exitoso de uno de estos sistemas de cultivo depende, en buena medida, de la obtención de un modelo de crecimiento robusto que simule las principales respuestas fotosintéticas de las células (P) bajo diferentes regímenes de iluminación (I) [2,3].

La mayoría de los modelos P-I carecen de aplicabilidad general porque tienen una base principalmente empírica, no considerando los mecanismos básicos que subyacen en la fotosíntesis. Las constantes cinéticas de tales modelos apenas tienen significado biológico. Frecuentemente, estos modelos no tienen en cuenta fenómenos fotoadaptativos que podrían modificar notablemente las respuestas P-I

proporcionando valores diferentes de los parámetros cinéticos. La mayoría de las respuestas que pueden simular estos modelos son de estado estacionario, obviando por tanto la influencia del tiempo cuando las condiciones medioambientales cambian con éste (ej. cultivos discontinuos, ciclos luz-oscuridad, irradiancia variable, limitación por nutrientes, etc.).

Alguno de estos problemas fueron resueltos por nuestro grupo mediante un modelo mecanístico aplicable a microorganismos fotosintéticos, y en particular a microalgas [4]. El modelo que se presenta rescata los fundamentos de aquél, adaptándolo para que interprete las respuestas más comúnmente observadas en los laboratorios donde se cultivan dinoflagelados. De esta forma, se convierte en una herramienta para el diseño de fotobiorreactores dedicados al cultivo de dinoflagelados pero también para interpretar la productividad primaria de estos microorganismos en aguas naturales.

Materiales y métodos

La especie de dinoflagelado utilizada ha sido *Protoceratium reticulatum* (GG1AM), cedida por el Dr. Franco del Centro Oceanográfico de Vigo. *P. Reticulatum* es productor de yessotoxinas [5-7]. Los experimentos se desarrollaron en modo discontinuo y por duplicado en T-flask (75 cm²; 3.1 cm de anchura), con medio L1, a 18 °C y ciclo luz-oscuridad 12:12. Los T-flask se iluminaron frontalmente mediante tubos fluorescentes de luz fría (30 W). El rango de irradiancias incidentes ensayado fue 13.6–300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El diámetro celular promedio fue determinado por citometría de flujo (citómetro Coulter Epics XL-MCL) utilizando bolas de látex de tamaños comprendidos entre 5 y 30 μm . Se analizaron los macronutrientes principales: nitratos mediante HPLC y fosfatos mediante espectrofotometría. El contenido en pigmentos y de YTXs [5] se determinó por HPLC de fluorescencia.

Resultados y discusión

En las Figs. 1 y 2 se ha representado la variación con el tiempo de la concentración celular y del biovolumen de la población de células a las diferentes irradiancias ensayadas. En principio, las cinéticas son típicas de cultivos fotolimitados. La irradiancia media de saturación pareció estar en torno a 180 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, las medidas de concentración de nitratos y fosfatos durante el tiempo de cultivo, así como las estimaciones de disponibilidad de CO₂ disuelto, nos permitió corroborar que a partir del 4º-5º día los cultivos más iluminados podrían estar limitados por estos nutrientes. Un modelo mecanístico basado en estas observaciones simuló los resultados obtenidos.

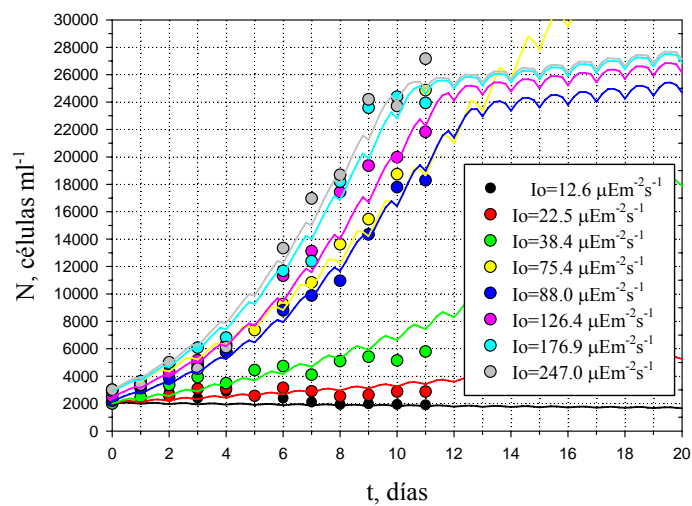


Figura 1. Variación de la concentración de células con el tiempo de cultivo en función de la irradiancia ensayada.

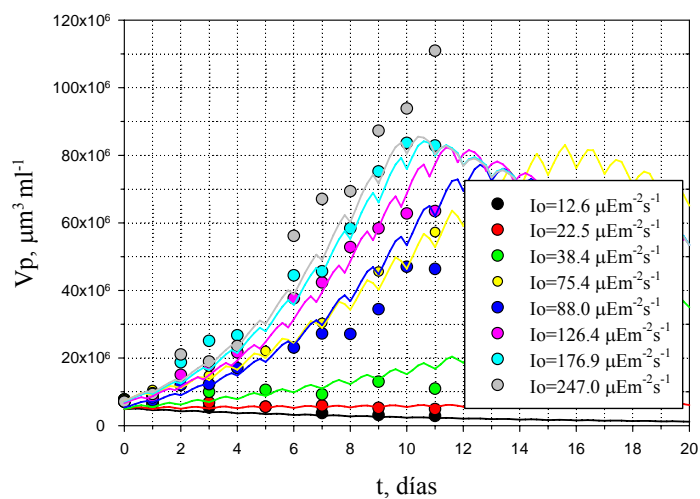


Figura 2. Variación del biovolumen de la población de células con el tiempo de cultivo en función de la irradiancia ensayada.

Las ecuaciones básicas del modelo se describen a continuación:

$$I_m(I_0, t) = \frac{\int_0^L I_0 \cdot \exp(-l \cdot N(t) \cdot K_A(t)) \cdot dl}{L}$$

$$\frac{dx^*}{dt} = k_a \cdot \left[I_m(I_0, t) \cdot (1 - x^*) - \frac{\alpha \cdot x^*}{\kappa + x^*} \right]$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[\mu_{mN} \cdot \frac{x^*}{\kappa + x^*} \cdot \frac{[NO_3^-]}{K_N + [NO_3^-]} \cdot \frac{[PO_4^{3-}]}{K_P + [PO_4^{3-}]} \cdot \frac{[CO_2]}{K_C + [CO_2]} - M_N(t) \right] \cdot N(t)$$

$$\frac{dV_p(t)}{dt} = \left[\mu_{mV} \cdot \frac{x^*}{\kappa + x^*} \cdot \frac{[NO_3^-]}{K_N + [NO_3^-]} \cdot \frac{[PO_4^{3-}]}{K_P + [PO_4^{3-}]} \cdot \frac{[CO_2]}{K_C + [CO_2]} - M_V(t) \right] \cdot V_p(t)$$

$$\underbrace{\frac{d[NO_3^-]}{dt}}_{\text{ACUMULACION DE NITRATOS EN EL MEDIO}} = \underbrace{\left[-Y_N \cdot \left(\frac{dN(t)}{dt} \right) \right]}_{\text{CONSUMO DE NITRATOS POR LAS CELULAS}} + \underbrace{\left[Y_N \cdot M_N(t) \cdot N(t) \cdot f \right]}_{\text{LIBERACION DE NITRATOS AL MEDIO POR LISIS CELULAR}}$$

$$\underbrace{\frac{d[PO_4^{3-}]}{dt}}_{\text{ACUMULACION DE FOSFATOS EN EL MEDIO}} = \underbrace{\left[-Y_P \cdot \left(\frac{dN(t)}{dt} \right) \right]}_{\text{CONSUMO DE FOSFATOS POR LAS CELULAS}} + \underbrace{\left[Y_P \cdot M_N(t) \cdot N(t) \cdot f \right]}_{\text{LIBERACION DE FOSFATOS AL MEDIO POR LISIS CELULAR}}$$

$$\underbrace{\frac{d[CO_2]}{dt}}_{\text{ACUMULACION DE CO}_2 \text{ EN EL MEDIO}} = \underbrace{\left[E \cdot k_1 a \cdot (S_{CO_2} - [CO_2]) \right]}_{\text{TRANSPORTE DE CO}_2 \text{ DESDE LA INTERFASE AL MEDIO}} - \underbrace{\left[Y_C \cdot \frac{dN(t)}{dt} + m_c \cdot N(t) \right]}_{\text{CONSUMO DE CO}_2 \text{ POR LAS CELULAS}}$$

donde:

- E , factor de aceleración del transporte de CO_2 debido a reacciones químicas del CO_2 en la suspensión celular.
- f , fracción de nitrógeno y fósforo liberada al medio por lisis celular en forma de nitratos y fosfatos respecto del nitrógeno y fósforo total de la célula.
- I_0 , irradiancia fotosintéticamente activa medida en la superficie del cultivo.
- I_m , irradiancia fotosintéticamente activa promediada en el interior del cultivo.
- K_A , coeficiente de extinción de la suspensión.
- k_a , coeficiente de absorción de irradiancia por mol de PSUs.
- K_C , constante de saturación para el carbono.
- K_N , constante de saturación para el nitrato.
- $k_1 a$, coeficiente volumétrico de transferencia de CO_2 a través de la superficie libre del cultivo.
- K_P , constante de saturación para el fosfato.
- l , camino óptico recorrido por el haz luminoso en el interior del cultivo.

- L , espesor del cultivo.
 m_C , velocidad específica de consumo carbón inorgánico del $\text{CO}_2(\text{aq.})$ para el mantenimiento celular.
 $M_N(t)$ velocidad específica de muerte celular.
 M_V , velocidad específica de disminución de biovolumen de la población.
 N , concentración celular.
 PSU unidad fotosintética de la célula.
 S_{CO_2} , solubilidad del CO_2 en agua de mar a la temperatura de cultivo.
 t , tiempo de cultivo.
 V_p , biovolumen de la concentración celular.
 x^* , fracción de PSUs activados en la célula.
 Y_C , coeficiente de requerimiento de carbón inorgánico del $\text{CO}_2(\text{aq.})$.
 Y_N , coeficiente de requerimiento de nitrógeno procedente del nitrato.
 Y_p , coeficiente de requerimiento de fósforo procedente del fosfato.

Letras griegas

- α , constante cinética cuya inversa representa la pendiente de la curva P-I.
 κ , fracción de PSUs activados a la que la velocidad de fotosíntesis es la mitad de su valor máximo.
 μ_{mN} , velocidad específica máxima de crecimiento expresada en base a número de células.
 μ_{mV} , velocidad específica máxima de crecimiento expresada en base a biovolumen de la población.

Los trazos continuos de las Figs. 1 y 2 representan los valores estimados con el modelo. Como se aprecia, éste simula las variables de respuesta medidas de manera satisfactoria. El modelo también logra explicar respuestas fotosíntesis-irradiación bajo diferentes condiciones de cultivo: iluminación intermitente (ciclos luz-oscuridad), iluminación continua, iluminación diurna solar, limitación simultánea del crecimiento por nutrientes, fotoaclimatación, condiciones iniciales del inóculo, entre otras. Esta cualidad lo hace idóneo para su empleo en el diseño de fotobiorreactores y en la simulación de HABs.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. José M. Franco y Dra. Beatriz Paz, del Centro Oceanográfico de Vigo, y a los Profesores Manuel Norte y J. Javier Fernández, del Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, por su inestimable ayuda en esta tarea del desarrollo de Bioprocesos relacionados con el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos para la producción de toxinas. Esta investigación está siendo financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-07924-C04-04), España.

Referencias

- [1] Camacho, F.G., J.J.G. Rodríguez, A.S. Mirón, M.C. García, E.H. Belarbi, Y. Chisti, E.M. Grima. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol Adv.* 25:176-94.
- [2] Camacho, F.G., C. Gómez, F.A. Fernández, J.F. Sevilla, E.M. Grima. 1999. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass culture. *Enzymol. Microb. Technol.* 24:164-172.
- [3] Fernández, J.F., F.G. Camacho, J.A.S. Pérez, J.F. Sevilla, E.M. Grima. 1997. A model for Light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol. Bioeng.* 55:701-714.
- [4] Rubio, F.C., F.G. Camacho, J.F. Sevilla, Y. Chisti, E.M. Grima. 2003. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 81:459-473.
- [5] Paz, B., J.A. Vázquez, P. Riobó, J.M. Franco. 2006. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. *Mar Environ Res.* 62:286-300.
- [6] Rodríguez, J.J.G., M.C.C. García, F.G. Camacho, A.S. Miron, E.H. Belarbi, E.M. Grima. 2007. New Culture Approaches for Yessotoxin Production from the Dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Biotechnol. Prog.* 23:339-350.
- [7] Souto, M.L., J.J. Fernández, J.M. Franco, B. Paz, L.V. Gil, M. Norte. 2005. Glycoyessotoxin A, a new yessotoxin derivative from cultures of *Protoceratium reticulatum*. *J. Nat. Prod.* 68:420-422.