

Ingeniería de Bioprocesos con dinoflagelados. Experiencias preliminares

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

Los dinoflagelados marinos tóxicos son una fuente extraordinaria de toxinas de gran valor, no solo para programas de investigación toxicológica, medioambiental, química y biomédica, sino también para la producción de fármacos de diferente aplicación. Dada la fragilidad celular de estos microorganismos su cultivo masivo necesita la utilización de biorreactores con configuraciones y modos de operación específicos que eliminen o mitiguen el daño celular por exceso de turbulencia.

En este trabajo se presenta una estrategia de cultivo basada en la Ingeniería de Bioprocesos para abordar el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos. El dinoflagelado *Protoceratium reticulatum* fue cultivado en biorreactores tipo tanque agitado con varios modos de operación: discontinuo, fed-batch, semicontinuo y continuo. Fueron analizadas la producción celular y de biotoxinas.

Introducción

La Ingeniería de Bioprocesos Marinos juega un papel esencial en el desarrollo y mejora de medios y condiciones de cultivo, y en el diseño y optimización de fotobiorreactores “a medida” para la producción de metabolitos de interés comercial a partir del cultivo de microalgas. La aplicación de la experiencia acumulada en este campo podría ayudar a paliar el escollo que supone el cultivo masivo de microalgas frágiles de la clase dinoflagelata productoras de biotoxinas de interés alimentario y farmacológico [1].

La *aireación y mezcla* son dos factores imprescindibles en la mayoría de fotobiorreactores destinados al cultivo de microalgas en suspensión. La aireación, porque proporciona CO₂ al medio de cultivo y la mezcla, bien sea mecánica y/o neumática, porque aumenta la disponibilidad que tienen las células de los nutrientes aportados al medio, tanto en forma gaseosa como disueltos, previniendo la limitación del crecimiento celular. A través de la mezcla se disminuyen las diferentes resistencias al transporte de materia.

El aumento de la intensidad de mezcla se consigue con una gran variedad de estrategias dependiendo del tipo de biorreactor utilizado; por ejemplo, aumentando la velocidad de agitación, modificando el tipo de

agitador, aumentando la velocidad de circulación del cultivo, utilizando tabiques deflectores y mezcladores estáticos, actuando sobre la forma de distribuir la aireación, etc. Todas estas estrategias generan una gran diversidad de campos de fuerzas de corte y fenómenos asociados a la interacción célula-burbuja en cualquier tipo de biorreactor agitado y/o aireado. El umbral de sensibilidad de los microorganismos cultivados a estos fenómenos es muy variado, es decir, interespecífico e incluso intraespecífico (dependiente de la cepa).

El problema de la agitación y mezcla toma gran relevancia cuando se trata de células frágiles porque se tiene que llegar a soluciones de compromiso entre la disminución de la velocidad de crecimiento por inhibición debida a fuerzas de corte y aumento de la velocidad de crecimiento por la mejora de las propiedades de transporte en el fotobiorreactor. La situación es más compleja cuando las células frágiles a cultivar son fotoautotróficas y requieren iluminación para su crecimiento. En este escenario, la mezcla y, por ende, la fluidodinámica adquieren una extraordinaria relevancia porque son las responsables de transportar células desde zonas menos iluminadas en el centro del fotobiorreactor hasta zonas próximas a la superficie sobradamente iluminadas.

En consecuencia, el cultivo masivo de células frágiles fotoautotróficas puede presentar una triple restricción asociada a la agitación: daño celular por fuerzas de corte, restricción de nutrientes por escasa mezcla e iluminación interna deficiente, también por insuficiencias en la mezcla. Pensamos que el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos fotoautotróficos se encuentra en esta última y compleja situación (la Fig. 1 resume este escenario). De hecho, trabajos previos demostraron que muchas especies productoras de biotoxinas son extraordinariamente sensibles a fuerzas de corte mecánicas e hidrodinámicas y a los fenómenos de turbulencia [2-5].

Sin embargo, a diferencia de otras microalgas, los dinoflagelados no han sido estudiados en profundidad desde el punto de vista de microorganismos de interés comercial, sino como microorganismos de interés ecológico y medioambiental. Por tanto, la carencia de información sobre el cultivo masivo de dinoflagelados con cierto éxito es evidente. En el trabajo que presentamos demostramos como con estrategias propias de la Ingeniería de Bioprocesos se puedan dar saltos cualitativos importantes en el área relacionada con la producción sostenible de biotoxinas.

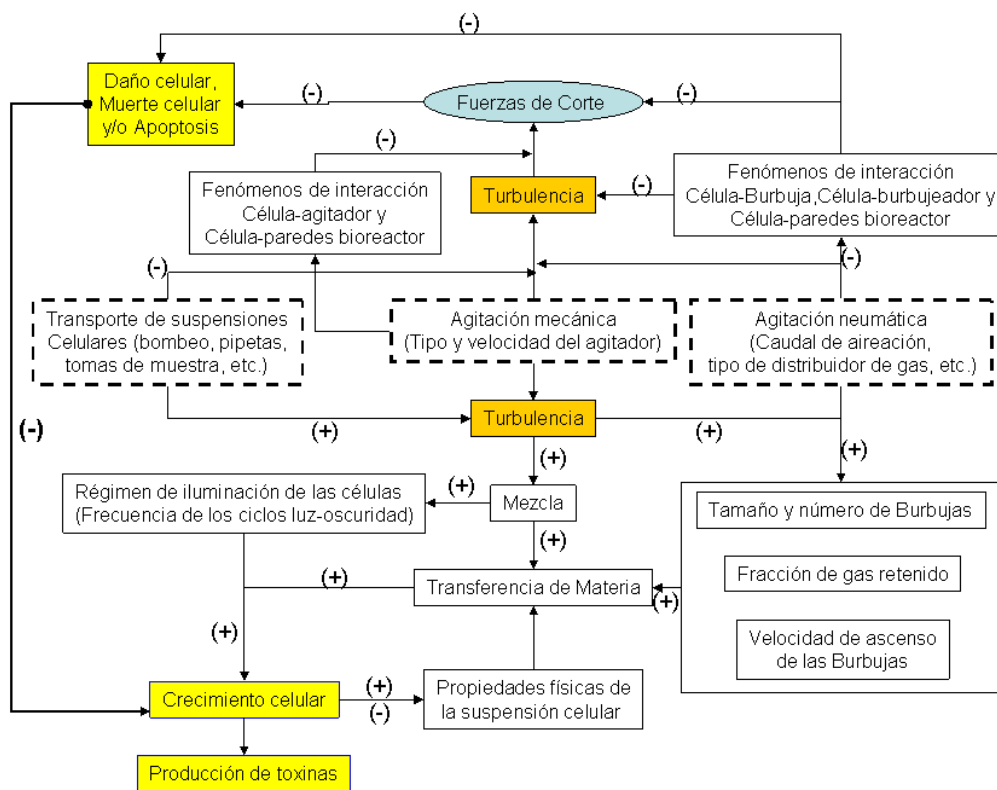


Figura 1. La turbulencia generada en los sistemas de cultivo aireados y/o agitados promueve el crecimiento celular de células robustas a través de mecanismos fácilmente identificables desde el punto de vista de la Ingeniería de Bioprocesos (efectos positivos marcados con el signo +). En el caso de células frágiles, tanto las fuerzas de corte generadas como los fenómenos de interacción célula-biorreactor debidos a la agitación y/o la aireación desencadenan complejas repuestas celulares que pueden dar lugar a daños reversibles o irreversibles en las células, lisis instantánea de células, fenómenos de adaptación y apoptosis que originan en el mejor de los casos inhibición del crecimiento y en el peor muerte celular (efectos negativos marcados con el signo -).

Materiales y métodos

El dinoflagelado modelo utilizado ha sido *Protoceratium reticulatum* (GG1AM), especie productora de yessotoxinas [6-8]. La cepa fue cedida por el Dr. Franco del Centro Oceanográfico de Vigo. El cultivo se llevó a cabo en biorreactores convencionales tipo tanque agitado de 2 L de capacidad provistos de medida y control de pH, O₂, T^a, etc. Éstos fueron iluminados mediante tubos fluorescentes de luz fría (30 W), dispuestos alrededor de los vasos. La temperatura de trabajo fue 18 °C y el medio de cultivo L1. Los cultivos se desarrollaron en modo discontinuo, fed-batch, semicontinuo y continuo. Todos ellos se combinaron con la utilización de un spin-filter interno con y sin perfusión. La agitación y la aireación se acomodaron para

evitar fuerzas de corte letales. Mediante citometría de flujo (citómetro Coulter Epics XL-MCL) se determinaron en el tiempo valores de autofluorescencia de la clorofila y carotenoides y diámetro celular promedio. Se analizaron los macronutrientes principales: nitratos mediante HPLC y fosfatos espectrofotométricamente. El contenido en YTXs se determinó por HPLC de fluorescencia [6].

Resultados y discusión

El modo fed-batch y el modo continuo con spin-filter proporcionaron los mejores rendimientos (ver Figs. 2 y 3). Los valores máximos de la concentración de células y de yessotoxinas en la suspensión fueron obtenidos en modo fed-batch. Éstos fueron casi un orden de magnitud más elevados que los publicados hasta ahora con esta especie (ver Fig. 2). Una de las conclusiones de este trabajo fue que el medio L1 era claramente deficiente en nitratos y fosfatos. Por lo que se justificaba una estrategia de adición de alícuotas de elevada concentración de estos nutrientes (flechas en la Fig. 2). Esto resulta más evidente a través de las velocidades de consumo celular de nitrato y fosfato calculadas, $2,1 \cdot 10^{-3}$ y $2,3 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol h}^{-1} \text{cél}^{-1}$, respectivamente, que fueron muy elevadas. Sin embargo, estos consumos produjeron un número muy bajo de células comparados con otras clases de microalgas, indicando que esta especie es un mal competidor en términos de utilización de nutrientes inorgánicos. La mayor producción de toxinas tuvo lugar cuando el número de células era más alto en el cultivo, manteniéndose una producción de yessotoxina por célula de alrededor de 1 pg cél^{-1} en el caso del reactor continuo, y de entre 2 y 4 pg cel^{-1} en modo fed-batch. La operación en modo continuo proporcionó concentraciones de células y de toxinas de estado estacionario más bajas que en modo fed-batch (ver Fig. 3) aunque la productividad fue mayor. La Tabla 1 muestra, a modo de resumen, los resultados obtenidos.

Los resultados preliminares en modo continuo nos permitieron demostrar que es posible cultivar dinoflagelados de forma estable en el tiempo, aunque no exenta de problemas. Se alcanzaron varios estados *quasi*-estacionarios a diferentes velocidades de dilución, aunque presentaron problemas algunos de estabilidad.

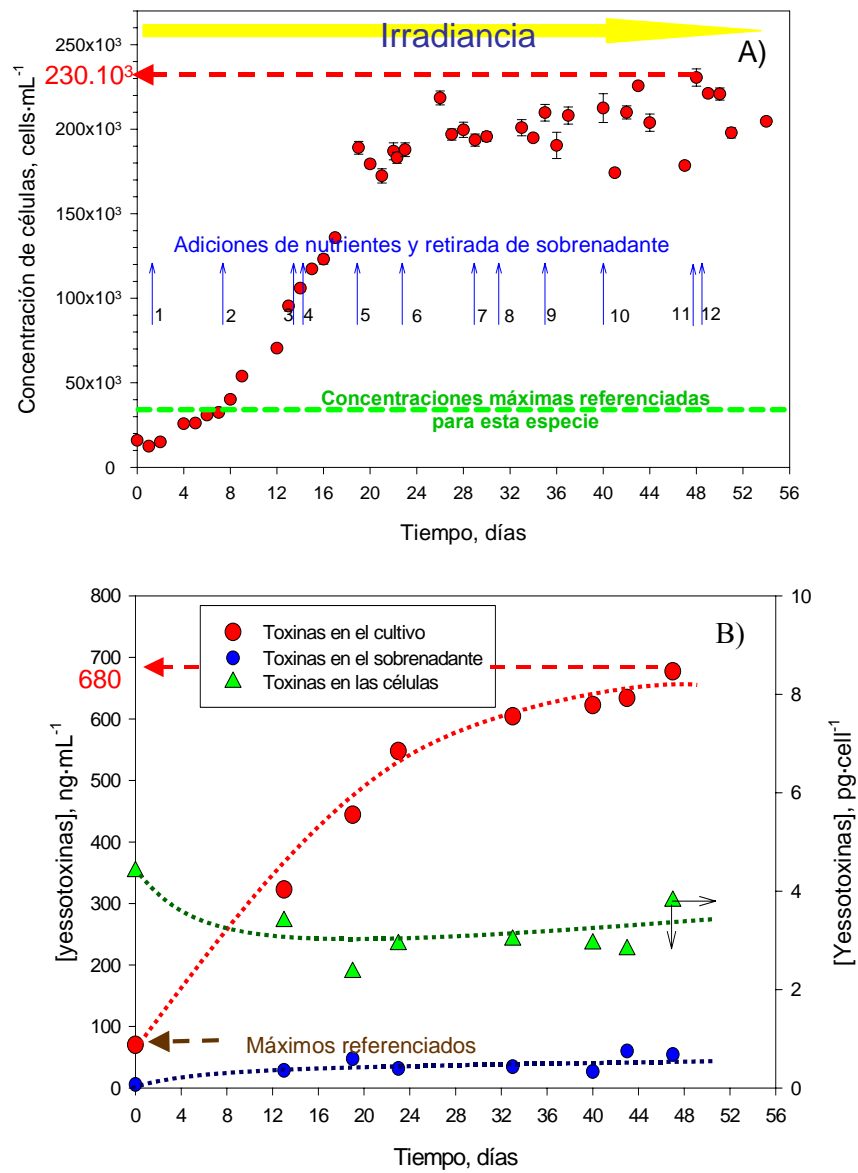


Figura 2. Cultivo Fed-Batch de perfusión con spin-filter interno. Evolución de la concentración de células A) y de toxinas B) con el tiempo de cultivo. Las flechas de Figura 2A indican adición de nutrientes.

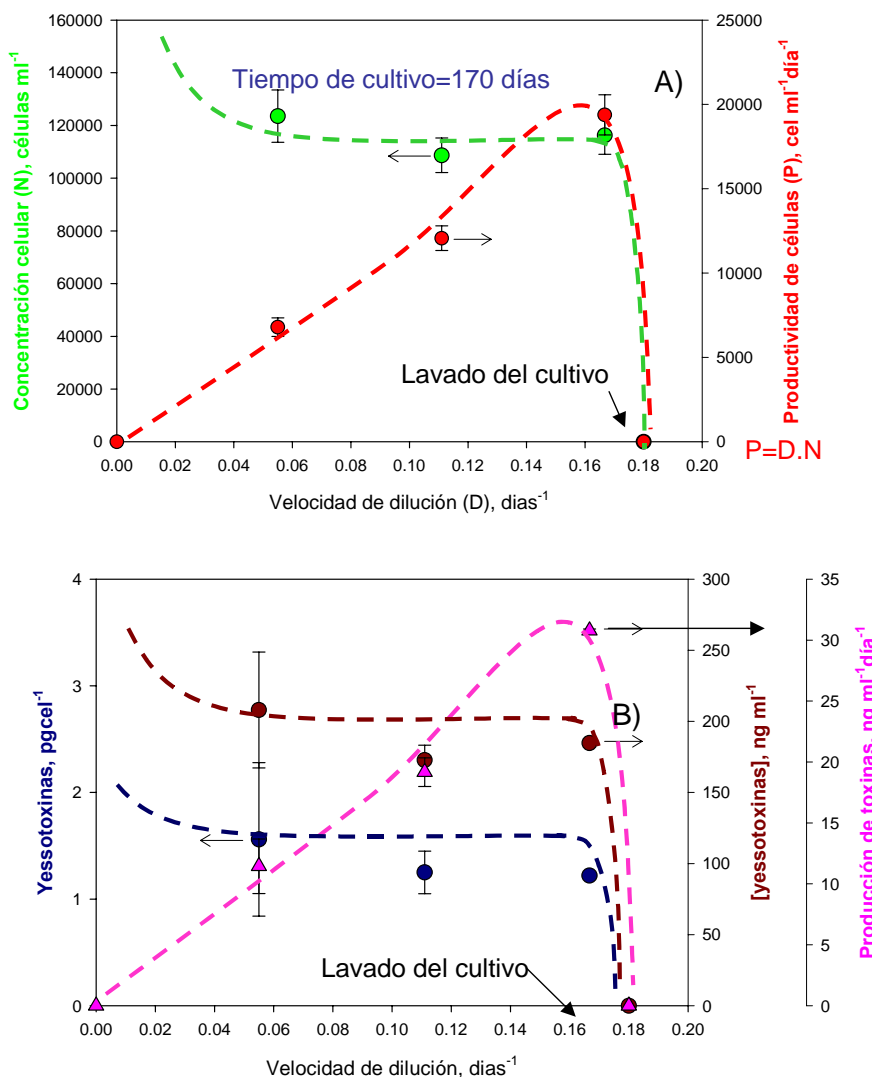


Figura 3. Cultivo continuo con spin-filter interno. A) Efecto de la velocidad de Dilución en la concentración y productividad de células en estado estacionario. B) Influencia en la concentración y producción de toxinas

	SM	PSF	CSF
Célula (pg cel ⁻¹)	4	3.57	1.5
Total cultivo (ng ml ⁻¹)	316	677	270
Productividad (µg L ⁻¹ día ⁻¹)		25	31

SM=semicontinuo sin spinfilter; PSF=Perfusión con spinfilter; CSF=continuo con spinfilter

Tabla 1.-Valores máximos de rendimiento en yessotoxinas de los mejores modos de cultivo ensayados.

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] Juhl, A.R., M.I. Latz. 2002. Mechanisms of fluid shear-induced inhibition of population growth in a red-tide dinoflagellate. *Journal of Phycology.* 38:683-694.
- [3] Sullivan, J.M., E. Swift, P.L. Donag, J.E. Rines. 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae.* 2:183-199.
- [4] Sullivan, J.M., E. Swift. 2003. Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates. *Journal of Phycology.* 39:83-94.
- [5] Berdalet, E., M. Estrada. 1993. Effects of turbulencia on several dinoflagellate species. En: Smayda, T.J., Y. Shimizu (Eds). *Effects phytoplankton blooms in the sea.* Elsevier Science Publishers. 737-740.
- [6] 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.
- [7] Rodriguez, J.J.G., M.C.C. Garcia, 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.
- [8] 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.