

Informe

“Caracterización del crecimiento de *Hematococcus pluvialis* con vistas a la producción de inóculos para cultivos en fotobiorreactores para la obtención de astaxantina”



Diciembre 2018



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Nuria Alcaraz Oliver
Javier Gilabert Cervera
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Universidad Politécnica de Cartagena
Paseo Alfonso XIII, 52
30203 – Cartagena
javier.gilabert@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

A petición de la sociedad GEOHABITAT S.L. se establece un convenio de colaboración entre la empresa y la Universidad Politécnica de Cartagena para una prestación de servicio al “GRUPO OPERATIVO DE INNOVACIÓN EN BIOECONOMIA DEL SURESTE”, el cual ha conseguido financiación a través de GALPEMUR (fondos FEMP y CARM) para la caracterización del crecimiento de *Hematococcus pluvialis* con vistas a la producción de inóculos para cultivos en fotobiorreactores para la obtención de astaxantina. El objetivo de este convenio caracterizar el crecimiento y producir inóculo para la fase de cultivo en fotobiorreactor. Este informe comprende los primeros datos obtenidos que, aun siendo provisionales, proporcionan una idea de las tasas de crecimiento de esta cepa en condiciones controladas.

Hematococcus pluviales es una especie con cierta dificultad en su crecimiento que en ocasiones puede provocar retardos prolongados cuando se cambian sus condiciones de cultivo. Este ha sido uno de los motivos del retraso tanto en la recepción de las células desde su petición al Banco Nacional de Algas de Canarias como de la obtención de la biomasa suficiente como para inocular los fotobiorreactores. El progreso realizado, no obstante, es prometedor y se han calculado tiempo de duplicación de la población en torno a 2 días por lo que se espera poder obtener biomasa suficiente en corto plazo.

Este informe está estructurado en un capítulo referente a la biología de *Haematococcus pluvialis* al que sigue otro de parámetros

de crecimiento. Seguidamente se describe la Recepción y aclimatación del cultivo para finalmente calcular la tasa de crecimiento de la cepa.

2. BIOLOGÍA DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*. MORFOLOGÍA CELULAR Y CICLO DE VIDA.

Haematococcus pluvialis es una microalga clorofícea de agua dulce perteneciente al orden Chlamydomonadales. Su tamaño oscila entre 8-50 μm dependiendo de su ciclo celular.

Se puede encontrar en diferentes estados o fases de crecimiento durante su ciclo de vida; 1) en la primera forma, donde se da el crecimiento, la célula es de color verde, denominándose “célula vegetativa” y presenta flagelos; 2) posteriormente existe una forma sin flagelos y verde se denomina “palmella”, y 3) otra forma roja denomina “aplanóspora”, donde se da la acumulación de astaxantina en grandes cantidades, que le proporciona el color rojo.

La aplanóspora se caracteriza también por poseer una pared celular extremadamente resistente que rodea la membrana plasmática formada en su mayor parte por un compuesto semejante a la esporopolenina. La célula vegetativa tiene una matriz extracelular gelatinosa que rodea la membrana plasmática aislándola del medio ambiente y que es mucho más lábil, además esta es la fase del ciclo en la que la microalga tiene un crecimiento activo.

Los cambios de fase en el crecimiento de *H. pluvialis* están caracterizados por la pérdida de los flagelos y la formación de una matriz extracelular gelatinosa, siendo más grande y resistente la célula como aplanóspora (Grünwald, Hagen, & Braune, 1997). La Figura 1 muestra un esquema de la morfología celular y el ciclo de vida (de Cremades & Directiva, n.d.)

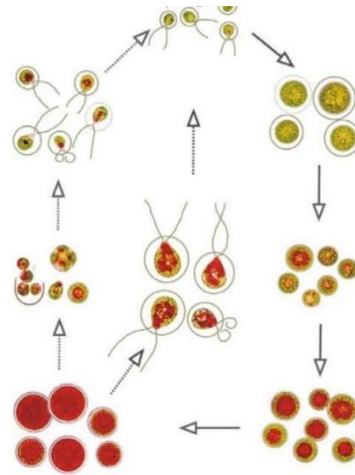


Figura 1. Ciclo celular del *Hematococcus pluvialis*.

3. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

El crecimiento de una microalga viene determinado por una gran cantidad de parámetros que no siempre controlables en su totalidad. El medio de cultivo, la temperatura, pH, luz y CO₂, son parámetros que requieren ser controlados en un cultivo en laboratorio. Seguidamente se describen algunos de los medios de cultivo y los valores de temperatura, pH, luz y CO₂ procedentes de una breve revisión bibliográfica.

2.1. MEDIO DE CULTIVO

Existen una gran variedad de medios de cultivo para *Haematococcus pluvialis*. Entre los más utilizados se encuentran:

BBM (Bold Basal Medium), BG11, RM (Rudic's Medium) y el medio de Waris-H, donde ha sido cultivado el inóculo de *H. pluvialis*, procedente de la Colección de Cultivos del Banco Español de Microalgas (Canarias).

A continuación, se incluyen las soluciones y componentes de cada uno de los medios indicados.

2.1.1. Bold's Basal Medium (BBM)

| # | Componente | Soluciones stock (g . L ⁻¹ dH ₂ O) | Adición por litro de medio de cultivo |
|----|---|---|---------------------------------------|
| 1 | NaNO ₃ | 25.00 | 10 ml |
| 2 | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 2.50 | 10 ml |
| 3 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 7.50 | 10 ml |
| 4 | K ₂ HPO ₄ | 7.50 | 10 ml |
| 5 | KH ₂ PO ₄ | 17.50 | 10 ml |
| 6 | NaCl | 2.50 | 10 ml |
| 7 | Solución alcalina de EDTA EDTA (Titriplex III) KOH | 50 31 | 1 ml |
| 8 | Solución de Hierro ácido FeSO ₄ · 7 H ₂ O H ₂ SO ₄ | 4.98 1 ml | 1ml |
| 9 | Solución de Boro H ₃ BO ₃ | 11.42 | 1ml |
| 10 | Solución de Metales Traza ZnSO ₄ · 7H ₂ O MnCl ₂ · 4H ₂ O MoO ₃ CuSO ₄ · 5H ₂ O Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 8.82 1.44 0.71 1.57 0.49 | 1ml |

Preparación de solución de cultivo.

Añadir reactivos y soluciones stock como se indica arriba a 1000 ml de agua destilada. El pH final debe ser 6.6.



2.1.2. BG11 Medium

| # | Componente | Soluciones stock (g . L ⁻¹ dH ₂ O) | Adición por litro de medio de cultivo |
|---|---|---|--|
| 1 | NaNO ₃ | | 1.5 g |
| 2 | K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O | 40.00 | 1 ml |
| 3 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 75.0 | 1 ml |
| 4 | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 36.0 | 1 ml |
| 5 | Ácido cítrico | 6.0 | 1 ml |
| 6 | Citrato de amonio de Hierro | 6.0 | 1 ml |
| 7 | MgNa ₂ EDTA · H ₂ O | 1.0 | 1 ml |
| 8 | Na ₂ CO ₃ | 20 | 1 ml |
| 9 | Metales Traza | | 1 ml |

Preparación de Solución de Metales Traza

| # | Metal | Adición por litro de agua bidestilada |
|---|---|---------------------------------------|
| 1 | H ₃ BO ₃ | 2.86 g |
| 2 | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 1.81 g |
| 3 | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.22 g |
| 4 | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.39 g |
| 4 | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.08 g |
| 6 | Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 0.05 g |

Preparación de solución de cultivo.

Añadir reactivos y soluciones stock como se indica arriba a 1000 ml de agua destilada. El pH final debe ser 7.4, ajustar con NaOH y autoclavar.

2.1.3. Medio Rudic

| Componentes del Medio Rudic (por litro): | |
|---|---|
| 300 mg NaNO ₃ | 1.5 mg MnSO ₄ ·H ₂ O |
| 20 mg KH ₂ PO ₄ | 0.08 mg CuSO ₄ ·5H ₂ O |
| 80 mg K ₂ HPO ₄ | 0.3 mg H ₃ BO ₃ |
| 20 mg NaCl | 0.3 mg (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O |
| 47 mg CaCl ₂ | 17 mg FeCl ₃ ·6H ₂ O |
| 10 mg MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 mg Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O |
| 0.1 mg ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 7.5 mg EDTA. |

2.1.4. Waris-H Medium

| # | Componente | Solución stock Adición por litro de solución stock | Adición por litro de medio |
|---|--|--|-------------------------------|
| 1 | KNO ₃ | 100.00 g | 1 ml |
| 2 | MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 20.00 g | 1 ml |
| 3 | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 20.00 g | 1 ml |
| 4 | Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O | 100.00 g | 1 ml |
| 5 | HEPES | 238.31 g | 1 ml |
| 6 | Metales P-II | | 1 ml |
| 7 | Fe-EDTA | | 1 ml |
| 8 | Vitaminas | | 1 ml |
| 9 | Extracto sólido | | 10 ml |

Preparación de Solución de Metales P-II

| # | Componente | Solución stock Adición por litro de solución stock |
|---|--|---|
| 1 | EDTA (Titriplex III)* | 3.00 g |
| 2 | H ₃ BO ₃ | 1.14 g |
| 3 | MnCl ₂ · 4 H ₂ O | 0.144 g |
| 4 | ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.021 g |
| 5 | CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 0.004 g |

Preparación de solución Fe-EDTA

| # | Componente | Concentración de solución stock Adición por litro de solución stock |
|---|--|--|
| 1 | EDTA (Titriplex II)* | 5.22 g |
| 2 | FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 4.98 g |
| 3 | 1 N KOH | 54.00 ml |

EDTA (Titriplex II) y FeSO₄ x 7 H₂O se calientan durante 30 minutos (100 ° C); Se añade KOH a la mezcla enfriada.

Preparación de la solución de vitaminas.

| # | Vitaminas | Concentración de solución stock Adición por litro de solución stock |
|---|--------------------------|--|
| 1 | Vitamina B ₁₂ | 0.20 mg |
| 2 | Biotina | 1.00 mg |
| 3 | Thiamina-HCl | 100.00 mg |
| 4 | Niacinamida | 0.10 mg |

Preparación de extracto sólido

Se mezclan 10 g de suelo de jardín con 120 ml de agua bidestilada y se hierven durante 10 minutos. Luego se centrifuga durante 10 minutos (baja velocidad) y el sobrenadante se filtra a través de una serie de filtros de membrana de 1,2 µm a 0,1 µm de tamaño de poro. El filtrado restante se ajusta a 100 ml con agua bidestilada. Se almacenan alícuotas de 10ml congeladas. El suelo no debe haber sido fertilizado recientemente y no debe contener demasiado humus..

Preparación de solución de cultivo.

Agregue 1 ml de soluciones madre (1-8) a 1000 ml de agua bidestilada. Agregue 10 ml de extracto de suelo descongelado (= solución madre 9), ajuste el pH a 7.0 y autoclave

* Titriplex II - Ácido etilendinitrilotetraacético - C₁₀H₁₆N₂O₈

* Titriplex III - Ácido etilendinitrilotetraacético sal hidratada disódica- C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ x 2 H₂O

Para optimizar los costes de producción, será necesario utilizar compuestos alternativos mucho más económicos tales como abonos procedentes de la agricultura, y poder formular un medio de cultivo óptimo con componentes de bajo coste.

2.2. TEMPERATURA Y PH

El rango óptimo de temperatura para el crecimiento de *H. fluvialis* se encuentra entre 25 y 30 °C, debiendo establecerse tras la realización de experimentos en laboratorio y en fotobiorreactor, la temperatura óptima de crecimiento, dependiendo de otros factores como el medio de cultivo a utilizar o la luz a la que estará sometido el cultivo.

En cuanto al pH, se debe de controlar, pero según la bibliografía no es excesivamente exigente y por tanto determinante para la producción de biomasa (Hanan *et al.*, 2013).

2.3. LUZ Y CO₂

La intensidad lumínica es uno de los factores más importantes tanto en el crecimiento de la célula como en la acumulación de astaxantina. Diferentes estudios concluyen en que la intensidad de luz óptima está directamente relacionada con la cepa seleccionada.

Mientras que unas cepas pueden sufrir inhibición en el crecimiento, otras pueden alcanzar velocidades de crecimiento elevadas para la misma fuente de irradiación. Por esta condición, las cepas deberán aclimatarse a las diferentes condiciones lumínicas en condiciones de laboratorio, para conocer el parámetro de crecimiento óptimo (Ramírez Landínez, 2013).

Utilizando el CO₂ como fuente de carbono se ha encontrado en la bibliografía que con concentraciones del 1% en volumen en el aire se optimiza el crecimiento de *H. pluvialis* (Kaewpintong *et al.*, 2007).

2.4. RESUMEN DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

De estos resultados se desprende que *Hematococcus pluvialis* es una especie con óptimo de crecimiento a temperaturas elevadas (25-30 °C), el pH no parece afectarse decisivamente en su crecimiento a los rangos de los medios de cultivo descritos, es necesario regular a luz en función de la cepa seleccionada.

4. RECEPCIÓN Y ACLIMATACIÓN DEL CULTIVO

Las microlagas se recibieron el 7 de diciembre procedentes del Banco Español de Algas de Canarias. El envío incluía 10 tubos con 15 ml de inóculo del microalga *Haematococcus pluvialis* y un litro de medio Waris-H en el que están inoculadas.

Se realizó una comprobación del estado de las *H. pluvialis* de cada uno de los tubos con la observación al microscopio invertido, comprobando la supervivencia de las cepas y que las células se encontraban en estado de “palmella”, es decir, sin flagelos.



Figura 2. Cultivos recibidos en el laboratorio.

Para reactivar los inóculos se procedió como se explica a continuación:

Se duplicaron cada uno de los 10 tubos en dos nuevos (Figura 3). Uno con medio Waris-H y otro con medio BBM para acondicionarlas al nuevo medio, más simple, sin vitaminas más cercano al de crecimiento en el en el biorreactor.

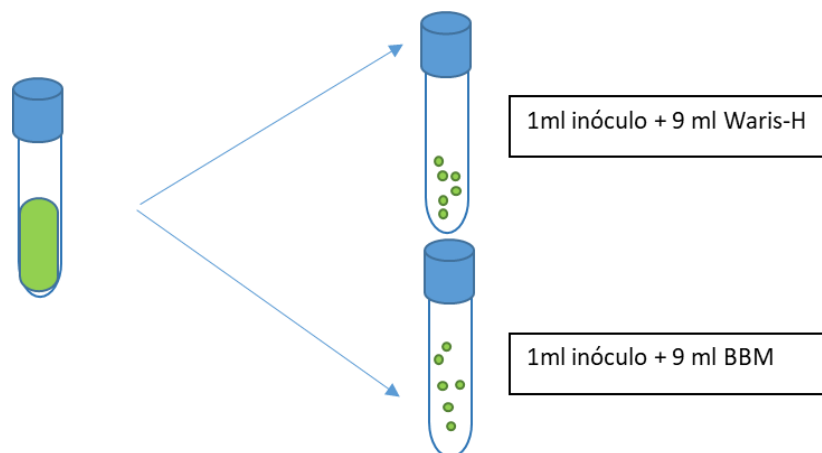


Figura 3. Cultivos duplicados en dos medios distintos.

Los tubos se introdujeron en el incubador para su aclimatación a las nuevas condiciones. Se inocularon además 2 matraces de 250ml de capacidad de cuello ancho, que, al igual que los tubos, se inoculan con medio BBM y medio Waris-H. En la Figura 4 se puede apreciar cómo en los primeros días de cultivo las células en medio Waris-H (derecha) crecieron más rápidamente que las de BBM (izquierda).



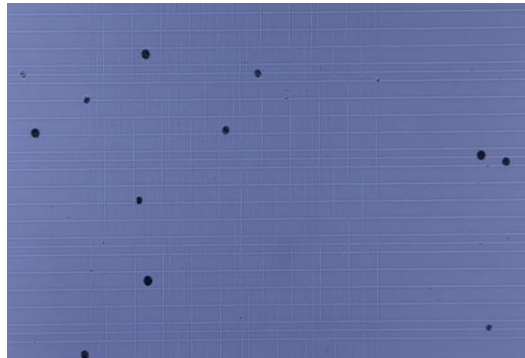
Figura 4. Cultivos en matraces en dos medios diferentes.

La cámara de cultivo, está dotado con luces LED de 4000 lumen, con un total de 4 lámparas, dos en la parte superior y dos en la parte inferior. Se colocaron 3 rejillas a distintas alturas creando condiciones distintas de intensidad lumínica de 200, 250 y 360 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tanto los tubos con las cepas, como los matraces se encuentran inicialmente en las condiciones que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones ambientales de la cámara de incubación.

| Medio de Cultivo | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | Luz $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | Ciclo de luz |
|------------------|------------------------------------|--|--------------|
| Waris-H | 22 | 200 | 12:12 |
| BBM | 22 | 200 | 12:12 |



5. CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO

Para caracterizar el crecimiento se realizaron curvas a partir de la densidad celular utilizando una cámara de recuento Thoma.

La superficie total de la cuadrícula de recuento es de 1 mm^2 , y se trata de un cuadrado grande central dividido en 16 cuadrados medianos cada uno de ellos en su interior con 25 cuadrados pequeños, 9 de los cuales están divididos por la mitad. La suspensión celular que queda tras poner la muestra bajo el cubreobjetos tiene una altura de 0,1 mm. Considerando el cuadrado grande central, el volumen contenido es de:

$$1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$$

Se han realizado desde el día 10 de diciembre los recuentos de cada uno de los matraces. Con esto se pretende establecer la tasa de crecimiento y tiempo de duplicación. La Figura 5 muestra una fotografía de las células sobre la cámara de recuento.

Figura 5. Células sobre la cámara de recuento.

Las microalgas presentan un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en las condiciones adecuadas. Las diferentes fases de crecimiento describen la forma en la que varía la concentración celular. Para ello se utilizaron dos parámetros tales como la tasa específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (T_2) que expresa el tiempo que tardaría la población en duplicarse.

La Tasa de crecimiento (μ) se calcula como:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t}$$

y el tiempo de duplicación como

$$T_2 = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Tras un periodo de aclimatación en el incubador se realizaron conteos de densidad celular para elaborar una primera curva de crecimiento. La Tabla 2 muestran los resultados obtenidos hasta la fecha.

Tabla 2. Datos recopilados de los recuentos celulares en los dos medios de cultivo.

| Inóculo: 4,5ml | | Cepa: <i>Haematococcus pluvialis</i> | | | | |
|----------------|-------|---|---------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Medio: 60 ml | | Medio Waris-H | | | Medio BBM | |
| Fecha | Horas | Días | Densidad | | Densidad | |
| | | | celular (cel/mL) | Tasa crecimiento μ (d-1) | celular (cel/mL) | Tasa crecimiento μ (d-1) |
| 07.12.2018 | 0 | 0,0 | 25000,0 | | 1666,6 | |
| 10.12.2018 | 24 | 1,0 | 25000,0 | 0,00 | 1666,6 | 0,00 |
| 12.12.2018 | 72 | 3,0 | 105000,0 | 1,44 | 17500,0 | 2,35 |
| 13.12.2018 | 120 | 4,0 | 142250,0 | 0,30 | 25000,0 | 0,36 |

La Figura 6 muestra las curvas obtenidas.

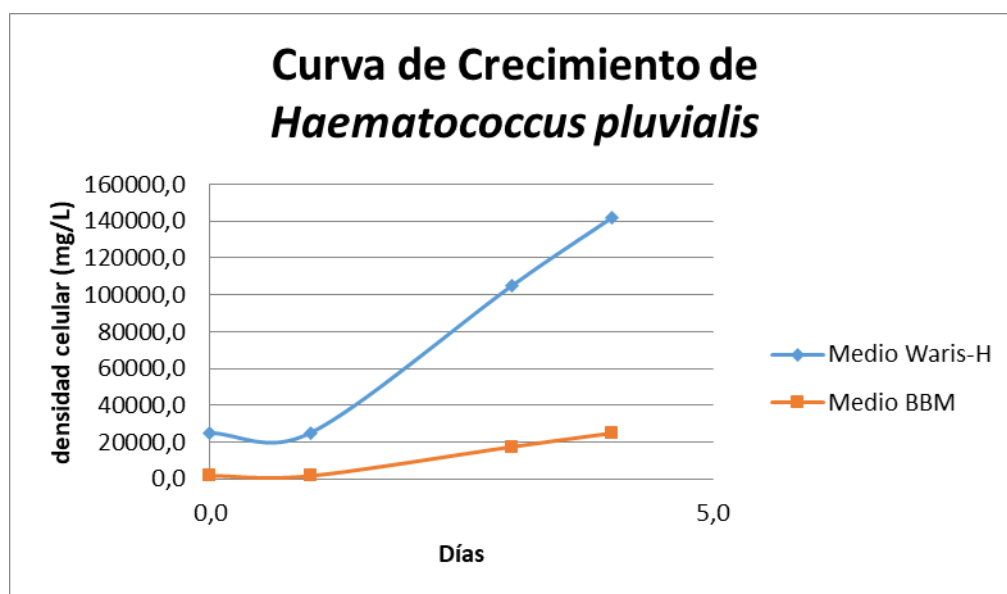


Figura 6. Representación gráfica de la curva de crecimiento de la cepa en cada uno de los medios de cultivo hasta hoy.

Los resultados obtenidos muestran que las tasas de crecimiento parecen tender a igualarse en los dos medios de cultivo con 0.30 y 0.36 d^{-1} para los medios Waris-H y BBM con tiempos de duplicación de 2.31

y 1.92 días para cada medio respectivamente, tras el primer retardo (*lag*) del crecimiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

Cremades, J., & Directiva, J. (n.d.). Sociedad Española de Ficología (S . E . F .).

Grünewald, K., Hagen, C., & Braune, W. (1997). Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*. *European Journal of Phycology*, 32(4), 387–392. <https://doi.org/10.1080/09670269710001737329>

Hanan, N. A., Al-Shorgani, N. K., Shukor, H., Abd Rahman, N., Sahaid Kalil, M., Asmidar, N., ... Sahaid, M. (2013). Pre-optimization conditions for *Haematococcus pluvialis* growth. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 3(2), 70–73. <https://doi.org/DOI: 10.18517/ijaseit.3.2.307>

Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., & Pavasant, P. (2007). Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, 98(2), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.011>

Ramírez Landínez, D. M. (2013). Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Tesis -Universidad Nacional de Colombia., 129.