

Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno

Liliana Gómez Luna^{*1}, Joaquín Menéndez², Inaudis Álvarez² e Ignacio Flores³. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Ecotoxicología. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Ave de las Américas Esqu. I s/n CP 90 400 e-mail: lilianag@cnea.uo.edu.cu

²Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Naturales. e-mail: jmenendez@cnt.uo.edu.cu; e-mail: inaudis@cnea.uo.edu.cu

³Bioalgal Marine, Almería, España.

RESUMEN

En este trabajo se estudia el efecto de un campo magnético de 0.03T sobre el crecimiento, la viabilidad celular y la acumulación de pigmentos en *H. pluvialis*, con el objetivo de validar su posible utilización a escala comercial. El campo magnético favoreció el crecimiento y la división celular al ser aplicado en la fase de crecimiento exponencial, con una incidencia directa sobre la síntesis de clorofilas. Aplicado durante 15 min o de forma permanente, permitió obtener densidades celulares máximas y una adecuada viabilidad celular, con una reducción del tiempo de cultivo, lo que constituye una ventaja a escala comercial. En cultivos desarrollados en ausencia de nitrógeno se estimuló el crecimiento celular, ofreciendo evidencias de una modulación de parámetros de crecimiento y viabilidad ante condiciones de estrés.

Palabras clave: astaxantina, campo magnético, clorofila, crecimiento celular, microalga

ABSTRACT

The effect of a magnetic field (0.03T) on growth, cellular viability and pigments accumulation in *Haematococcus pluvialis* was studied in order to validate potentialities for market. Magnetic field favored growth and cellular division when applied in the exponential phase of growth, with a direct incidence on chlorophylls synthesis. Culture exposition to magnetic field; during 15 min or in a permanent way, favored to obtain maximum cellular densities and an appropriate cellular viability. Culture time was reduced as an advantage for commercial scaling processes. Magnetic field stimulated cellular growth of cultures in N-starvation conditions, offering evidences of a growth and viability modulation induced by stress.

Keywords: astaxanthine, cellular growth, chlorophyll, magnetic field, microalgae

INTRODUCCIÓN

Desde 1930 la microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow (*Volvocales*, *Clorofícea*) ha sido reconocida por su habilidad para acumular grandes cantidades del cetocarotenoide astaxantina, un potente antioxidante con aplicaciones nutricéuticas y farmacológicas (Guerin *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Kamath *et al.*, 2008) de comprobada inocuidad (Stewart *et al.*, 2008). El interés por este microorganismo se ha renovado debido a la gran demanda de alternativas naturales para la pigmentación de salmones, camarones, truchas, huevos, en la avicultura y su extenso uso en la industria médico-farmacéutica y cosmética, reconociéndose como una de las especies más importantes en la industria biotecnológica (Boussiba, 2000; Göksan y Ak, 2006). Sin embargo, a pesar de existir experiencia documentada de su cultivo

autotrófico a gran escala, el desarrollo de éstos es complejo y se han dedicado grandes esfuerzos a optimizarlos, para disminuir costos y aumentar las ganancias (Dalay *et al.*, 2007; Del Río *et al.*, 2008; García-Malea *et al.*, 2008; Kang y Sim, 2008).

H. pluvialis es una especie unicelular, dulceacuícola, con poca tolerancia a ambientes extremos, que acumula gran cantidad de astaxantina al entrar en fase de latencia o "hematoquiste". No obstante, su importancia económica y aplicabilidad, exhibe algunas características desfavorables para su desarrollo a escala comercial, lo que está relacionado principalmente con una baja tasa de crecimiento y un complejo ciclo de vida (Triki *et al.*, 1997). Muchos esfuerzos se han dirigido a incrementar las tasas de crecimiento que van desde 0.2 div.día⁻¹ en cultivos a gran escala (Olaizola, 2000), hasta 0.44-0.72 div.día⁻¹ a escala de laboratorio (Chaumont y

Thèpenier, 1995; Orosa *et al.*, 2001a; Orosa *et al.*, 2005) con máximos, excepcionalmente, alrededor de $0.9 \text{ div. día}^{-1}$ (Orosa *et al.*, 2001b; Cifuentes *et al.*, 2003). Otros trabajos centran su análisis en las densidades celulares máximas, que van de 1.5 a $2.5 \times 10^5 \text{ cel. ml}^{-1}$ y hasta $5.5 \times 10^5 \text{ cel. ml}^{-1}$, de forma excepcional (Bubrick, 1991; Kobayashi *et al.*, 1993; Cifuentes *et al.*, 2003). Básicamente, las investigaciones sobre esta especie han estado enfocadas a mejorar parámetros de crecimiento y estimular la producción de astaxantina, considerando las etapas principales de la mayoría de los procesos productivos (Bubrick, 1991). Sin embargo, subyacen aspectos teóricos básicos que constituyen puntos clave en el debate actual sobre la fisiología y metabolismo de *Haematococcus*. Por una parte, la acumulación de astaxantina se ha asociado estrictamente al enquistamiento de la célula ante situaciones de estrés (Kobayashi *et al.*, 1991; Sarada *et al.*, 2002); mientras que algunos trabajos demuestran la acumulación de astaxantina en células móviles en estado vegetativo (Chaumont y Thèpenier, 1995), situación que podría considerarse ventajosa a efectos de la producción comercial, pues los quistes son resistentes a la extracción con solventes, enzimas o ruptura mecánica (Brinda *et al.*, 2004).

No existen precedentes conocidos del efecto del campo magnético sobre esta especie. Si bien existen trabajos en cianobacterias (Ascoli *et al.*, 1978; Singh *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007) y en *Chlorella* (Gómez *et al.*, 2007) que explican un claro efecto sobre parámetros de crecimiento; lo que puede atribuirse tanto a problemas para la reproducibilidad de los experimentos, como a la diversidad de respuestas y factores que le condicionan, lo que ha limitado incluso la postulación de mecanismos de acción.

El presente trabajo se enfoca hacia determinar el efecto de un campo magnético de 0.03T sobre el crecimiento, la viabilidad y acumulación de pigmentos en *H. pluvialis*; la explicación de posibles mecanismos de acción, así como al estudio de su comportamiento en condiciones de estrés. Se utilizan diferentes protocolos de aplicación del campo magnético, considerando como variable fundamental, el tiempo de exposición de las células en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo, mantenimiento de inóculos y cultivo

Haematococcus pluvialis fue aislada de bebederos naturales de aves y clasificada con ayuda de claves dicotómicas y varios criterios taxonómicos (Thompson y Wujek, 1989; Nozaki, 2003). Sus características morfológicas coinciden con las de la cepa de la Colección de Cultivo de Algas y Protozoos (CCAP) (FBA Ambleside Cumbria, UK -

34/7) del Laboratorio Windermere. Esta ha sido mantenida desde su aislamiento en la colección de microalgas del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento y desarrollo de los cultivos fue el Bristol (Starr y Zeikus, 1987) ajustando el pH a 6. Los cultivos de ensayo (250 ml) se desarrollaron a partir de inóculos de un cultivo unialgal no axénico en fase exponencial, en condiciones de fotoautotrofia, aireado, sin suministro de CO_2 ; con un régimen de luz continua a una densidad de flujo fotónico de $59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $20^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. A partir de entonces se desarrollaron cultivos asincrónicos, aireados (0.45 l. min^{-1}) y discontinuos. La iluminación ($110 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) se logró con dos lámparas fluorescentes SYLVANIA 40W/F40T12/ D DAYLIGHT.

Descripción de los experimentos

Se realizaron experimentos para evaluar el efecto de la exposición permanente de un campo magnético de 0.03T sobre el crecimiento, la viabilidad celular y composición pigmentaria de células en cultivo de *H. pluvialis* en condiciones de suficiencia y ausencia de nitrógeno; así como el efecto del tiempo de exposición del campo magnético (15 min, 30 min y 1 h), aplicado en fase exponencial temprana (7^{mo} día). En todos los casos se establecen cultivos controles, no expuestos al campo magnético. En la tabla 1 se presenta un resumen de los experimentos realizados y las condiciones básicas establecidas. Se trabajó con una configuración de imanes de neodimio con un valor medio de intensidad de campo magnético de 0.03T y un gradiente de variaciones de 0.013 a 0.061T .

Los cultivos fueron desarrollados en una instalación en la que fue determinada *a priori* la interferencia electromagnética de campos de baja frecuencia (hasta 300 Hz), con ayuda de un Tester TES 1390 (0.01 - $1999.9 \mu\text{T}$) cumpliendo con las directrices de la Comisión Internacional de Protección contra la Radiación No Ionizante (ICNIRP) (OMS, 2008) para métodos de medición no isotrópicos. Esta determinación constituye un hecho novedoso en este campo de investigaciones. Debido al desconocimiento existente respecto a la variación electromagnética en las instalaciones de cultivo y su efecto sobre los sistemas biológicos, muchas veces se exponen cultivos a campos electromagnéticos de baja frecuencia, que provocan alteraciones, sin que estas sean consideradas. Para eliminar dicha interferencia se hizo un estudio previo de la instalación, ubicando zonas críticas ($> 0.25\mu\text{T}$) y óptimas. Se considera como la interferencia máxima permisible, el límite restrictivo más riguroso, asumido por la directriz Sueca (OMS, 2008).

Tabla 1. Condiciones experimentales de los ensayos realizados con *Haematococcus pluvialis*.

No.	Fuente de Nitrógeno	DFF $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Daylight)	C_i cél $\text{ml}^{-1} \times 10^4$	pH	Variable de ensayo
1	NO_3	110	0.75	6	CM permanente
2	NO_3	110	0.75	6	Tiempo 15, 30 min., 1h
3	-	110	18.5	6	CM permanente

Determinaciones sobre las células en cultivo

Se realizaron determinaciones de densidad celular por recuento diario de una alícuota de los cultivos en un hematocitómetro Neubauer, por triplicado. A partir de los datos diarios de densidad celular se calcularon las tasas de crecimiento (k ; doblajes celulares o divisiones por día) en la fase exponencial (k_{med}) y la máxima ($k_{\text{máx}}$), mediante la expresión: $k = (\log_2 N_t - \log_2 N_o) / (t_t - t_o)$, donde: N_t y N_o son las densidades celulares ($\text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}$) a los tiempos t_t y t_o .

Se determinó, además, el total de quistes, células no móviles y células móviles, calculando no sólo el porcentaje de quistes respecto al total de células; parámetro recomendado para el estudio del *status* de los cultivos a escala de laboratorio (Cifuentes *et al.*, 2003), sino que se introdujo el índice Q o de quiescencia (razón entre células no móviles y móviles); relacionado indirectamente con la viabilidad.

Análisis de la concentración de pigmentos: clorofilas y astaxantina

A partir de células recogidas mediante centrifugación durante 5 min. a 6 000 g, se realizó una extracción de pigmentos con dimetil sulfóxido (DMSO) (p.a. Merck) (Sedmak *et al.*, 1990) sin precalentamiento, modificando el protocolo original. Después de retirar cuidadosamente el sobrenadante, se añadió un volumen de 3 ml de DMSO; sonicando luego durante 3 min. con una sonda ultrasónica Bioblock Scientific de 75W. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Genesys 10UV (1-4 nm). Para el cálculo de la concentración de las clorofilas totales ($C_a + C_b$) se utilizaron las ecuaciones de Wellburn (1994): Clorofila a ($\mu\text{g ml}^{-1}$) $C_a = 12.19A_{665} - 7.45A_{649}$; Clorofila b ($\mu\text{g ml}^{-1}$) $C_b = 21.99A_{649} - 5.32A_{665}$, expresando al final los resultados en pg cel^{-1} .

La concentración de astaxantina se determinó según la ecuación: $C_{\text{Axt}} (\text{mg ml}^{-1}) = (A_{492} \times V \times f) / 2220$ (Davis, 1976) donde: V es el volumen en ml, f el factor de dilución y 2220 el coeficiente de extinción molar de la astaxantina. Los resultados se expresan finalmente en pg cel^{-1} .

Análisis de datos y estadística

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple ($p < 0.05$), con contraste

múltiple de rango para analizar las diferencias entre las tasas de crecimiento obtenidas en los controles y en los cultivos expuestos al campo magnético, así como las densidades celulares máximas obtenidas en cada caso. Se realizaron análisis de correlación bivariada utilizando el coeficiente de Spearman, considerando diferencias significativas para $p < 0.01$, para analizar la variación del coeficiente Q con los tiempos de exposición de los cultivos al campo magnético. Se utilizaron las bondades del SPSS v12.0, el Statgraphics Plus v5.1 y del Origin v6.0, tanto para los análisis estadísticos como para la elaboración de gráficos y los análisis de cómputo básicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento de *H. pluvialis*

El campo magnético ejerció un efecto sobre el crecimiento celular diferente cuando fue aplicado de forma permanente, respecto a su aplicación durante periodos de tiempo de 15 min, 30 min y 1 h, en la fase exponencial temprana (7^{mo} día de cultivo). Cuando se aplicó de forma permanente, favoreció el crecimiento celular y se obtuvieron densidades celulares máximas a los 16 días de cultivo ($123.0 \pm 2.83 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$), valores que no difieren significativamente de los controles, desarrollados sin exposición al campo magnético ($125.5 \pm 3.54 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$) ($p < 0.01$). Estos últimos alcanzaron máximas densidades celulares a los 17 días de cultivo. La aplicación del campo magnético de forma permanente podría representar entonces, el adelanto de un día o dos en la cosecha a escala comercial, lo que sin dudas contribuiría a minimizar costos de producción.

En los cultivos a los que se aplicó el campo magnético durante 15, 30 min y 1 h, las densidades celulares máximas se obtuvieron a los 14 días; sin embargo, estas fueron significativamente inferiores ($96.5 \pm 2.12 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$; $86.88 \pm 3.01 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$; $83.82 \pm 1.66 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$) a las obtenidas en los controles, desarrollados sin exposición al campo magnético y también significativamente inferiores a las que se obtuvieron con la exposición al campo magnético de forma permanente ($p < 0.05$). A partir del día 15 comenzó a registrarse en estos cultivos (15, 30 min y 1 h

de exposición al campo magnético), muerte celular (Figura 1). Mientras mayor fue el tiempo de exposición mayor fue la reducción de las densidades celulares máximas, en el rango ensayado, siendo menores en los cultivos expuestos al campo magnético por 1h. La mayor estimulación del crecimiento en condiciones de exposición permanente y durante 15 min se observó en la fase exponencial del crecimiento. Resultados similares han sido descritos para *S. platensis* expuesta a un campo electromagnético de 0.25T (Zhi-Yong *et al.*, 2007). Un aspecto clave al analizar los resultados es el potencial de esta cepa de *Haematococcus* para el desarrollo de cultivos comerciales, ya que los valores más bajos de densidad celular máxima ($83.82 \pm 1.66 \times 10^4$ cel.ml⁻¹) fueron superiores a los informados por varios autores (Bubrick, 1991; Kobayashi *et al.*, 1993; Cifuentes *et al.*, 2003).

Las tasas de crecimiento exponencial y máxima (Tabla 2) fueron significativamente mayores en todos los cultivos expuestos al campo magnético, siendo máximas en aquellos que se expusieron durante 15 min ($p < 0.05$). Los valores estuvieron en el rango descrito por varios autores para *H. pluvialis* (Chaumont y Thèpenier, 1995; Orosa *et al.*, 2001^a; Cifuentes *et al.*, 2003).

Los resultados indicaron que el campo magnético aplicado durante la fase exponencial por 15, 30

min y 1h acelera el proceso de división celular pero reduce la densidad celular máxima, lo que puede ser evidencia de un efecto de envejecimiento celular, que se corrobora al analizar las cinéticas de los cultivos. La fase estacionaria se alcanzó mucho antes en los cultivos expuestos por diferentes tiempos al campo magnético respecto a los cultivos controles, desarrollados sin campo magnético y los que se expusieron de forma permanente. Este efecto es reflejo de una compleja respuesta ante una perturbación del equilibrio metabólico del sistema, en la que pudieran estar involucradas varias enzimas, y procesos de transporte a través de las membranas. El incremento de las tasas de crecimiento pudiera estar asociado a un aumento de la incorporación de nutrientes, lo que ha sido referido para células de *S. platensis* expuestas al campo electromagnético (Zhi-Yong *et al.*, 2007). En experimentos realizados con esta cianobacteria se explica además, un crecimiento rápido debido al aumento en la velocidad de consumo de nitrógeno y fósforo (Li *et al.*, 2007). Por otra parte, experimentos llevados a cabo en *Paramecium caudatum* con campo magnético (4.3T, 96 h) permitieron aseverar que, independientemente de la polaridad y período de exposición, el campo magnético redujo el crecimiento, e inició una senescencia temprana de la población (Elahee y Poinapen, 2006)

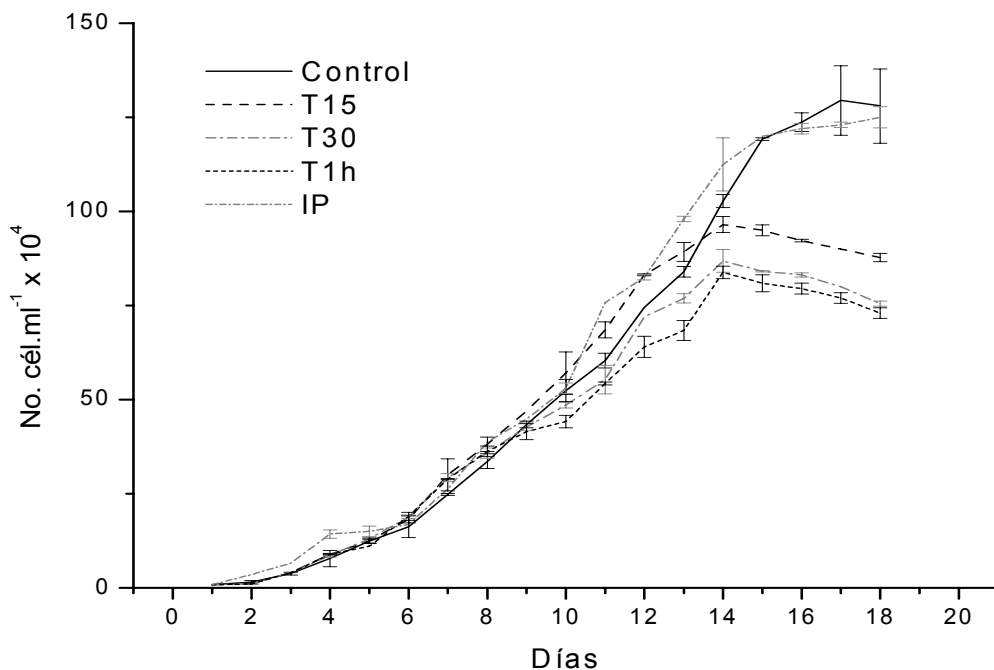


Figura 1. Cinética de cultivos de *H. pluvialis* expuestos a un campo magnético de 0.03T aplicado de forma permanente (IP) y a diferentes tiempos en la fase exponencial del crecimiento: 15 min (T15), 30 min (T30) y 1h (T1h) (Se grafican los valores medios $n=3$, las líneas verticales representan el error estándar, EE).

Tabla 2. Variación de las tasas de crecimiento exponencial y máxima en cultivos de *H. pluvialis* con diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (CM) de 0.03T: 15 min, 30 min, 1h y permanente. (Se tabulan los valores medios $n=3 \pm EE$). Las medidas con letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de ANOVA simple con contraste múltiple de rango.

Experimento	k_{exp}	$k_{m\acute{a}x}$
Control	0.416±0.023	0.473±0.010
CM 15 min.	0.535±0.011	0.717±0.010
CM 30 min.	0.537±0.014	0.642±0.017
CM 1h	0.532±0.013	0.604±0.011
IP	0.523±0.021	0.646±0.022

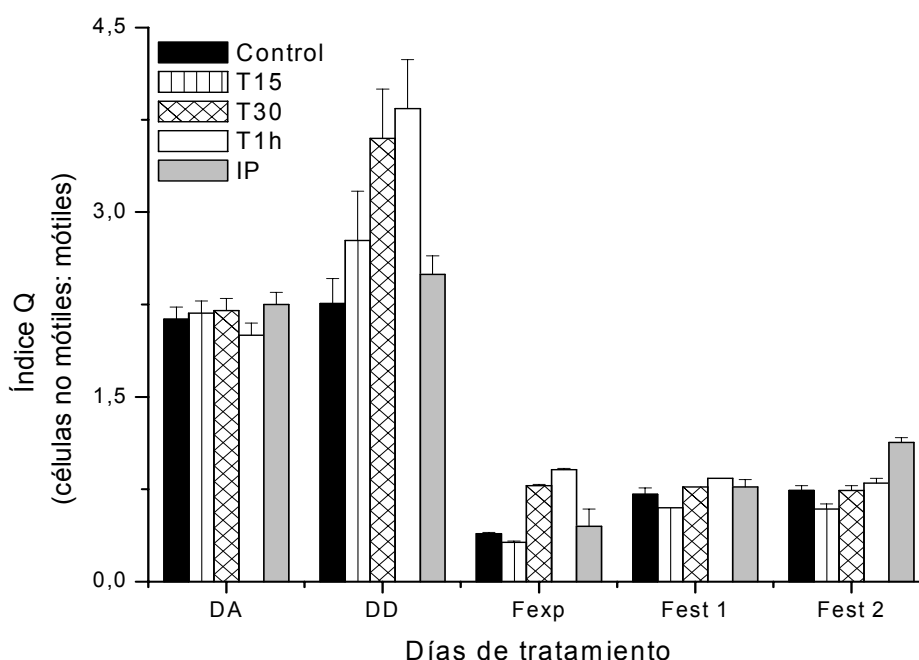


Figura 2. Variación del índice Q en cultivos de *H. pluvialis* expuestos a la acción de un campo magnético (CM) de 0.03T durante 15 min (T15), 30 min (T30), 1h (T1h) y con exposición permanente (IP), en diferentes fases del crecimiento: 7^{mo} día, antes de la aplicación del CM (DA); 8^{vo} día, después de la aplicación del CM (DD); 11^{no} día, Fase exponencial (F_{exp}); Fase estacionaria (F_{est}) día 14 (temprana) y día 18 (tardía). (Se grafican los valores medios $n=3$, las líneas verticales representan el EE) ** Correlación Spearman's rho significativa (Q vs tiempo de exposición; $p<0.01$, 2-colas).

Efecto del campo magnético (0.03T) sobre la viabilidad celular de *H. pluvialis*

El índice Q tuvo una relación inversa con la viabilidad celular; esta aumentó con el tiempo de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial ($p<0.01$). Existieron diferencias significativas entre los valores de Q obtenidos para todos los cultivos ($p<0.05$) entre la fase exponencial y estacionaria, e incluso entre diferentes días, dentro de cada fase. En este caso correspondieron a la fase exponencial los días 7,8 y 11; y a la estacionaria, los días 14 y 18, que corresponden al inicio de la fase y a un estado avanzado de esta. Al comparar los valores de Q el día antes (DA, 7^{mo}) y el día

después (DD, 8^{vo}) de aplicado el campo magnético, estos fueron significativamente diferentes, excepto para el control sin campo magnético y el cultivo expuesto de forma permanente ($p<0.01$) (Figura 2). La viabilidad resultó severamente afectada por la exposición al campo magnético, dependiendo del tiempo de exposición ($p<0.01$). El índice Q aumentó drásticamente 24h después de aplicado el campo magnético. Existió una fuerte correlación ($p<0.01$) directa entre la disminución de la viabilidad (aumento de Q) y el aumento del tiempo de exposición al campo magnético de 0.03T, en el rango de tiempo ensayado ($r=1$; coeficiente de Spearman). Este hecho constituye una evidencia para aseverar que la exposición al campo

magnético es un factor de estrés para los cultivos de *H. pluvialis*. La variación del índice Q a las 24h de exposición en el rango de tiempo ensayado (15 min, 30 min y 1 h) se ajusta a una función exponencial ($y = 0.5475e^{1.1764x}$; $R^2=0.91$).

Al calcular el porcentaje de quistes, respecto al total de células no móviles, se obtuvo como resultado que el campo magnético promueve la formación de quistes ($p < 0.05$), siendo mayor este porcentaje (>90%) en los cultivos expuestos por 15 min (Figura 3). Este resultado es sólo comparable con el porcentaje de quistes obtenidos en la fase estacionaria tardía. Este hallazgo podría ser clave para el manejo de cultivos a gran escala.

La exposición al campo magnético por 15 min o de forma permanente en condiciones de suficiencia de nitrógeno podría ser beneficioso para obtener mayores densidades celulares en tiempos relativamente cortos, garantizando la viabilidad celular y el tránsito rápido hacia la formación de haematoquistes, lo que traería ventajas a escala comercial. Es importante considerar este

comportamiento para el desarrollo de cultivos continuos.

Efecto de un campo magnético (0.03T) sobre la composición pigmentaria de *H. pluvialis*

Para una mejor comprensión de los procesos metabólicos que tienen lugar en las células al exponerse al campo magnético se hizo un análisis de la variación de la composición pigmentaria por tratamiento, en diferentes fases del cultivo, considerando dos momentos de la fase exponencial (antes y después de aplicado el campo magnético) y la fase estacionaria (día 18) (Figura 4).

De forma general, las células expuestas al campo magnético presentan una concentración de clorofilas por célula menor que los controles, tanto en la fase exponencial tardía (11^{no} día) como en fase estacionaria ($p < 0.05$), independientemente del tiempo de exposición, lo que podría ser una evidencia de un efecto del campo magnético sobre la síntesis de clorofilas.

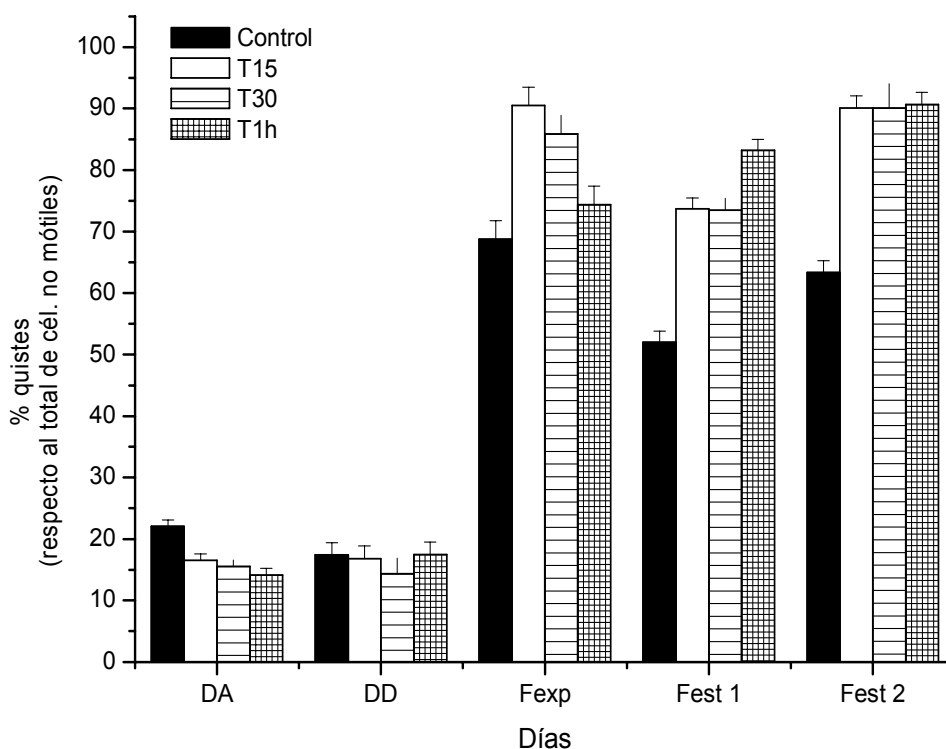


Figura 3. Porcentaje de quistes respecto a las células no móviles en cultivos de *H. pluvialis* expuestos a la acción de un campo magnético (CM) de 0.03T durante 15 min (T15), 30 min (T30), 1h (T1h) y con exposición permanente (IP), en diferentes fases del crecimiento: 7^{mo} día, antes de la aplicación del CM (DA); 8^{vo} día, después de la aplicación del CM (DD); 11^{no} día, Fase exponencial (F_{exp}); días 14 ó 18, Fase estacionaria (F_{est}). (Se grafican los valores medios $n=3$, las líneas verticales representan el EE).

Las clorofilas totales pueden disminuir debido a una mejoría de la eficiencia fotosintética, por activación de sistemas multienzimáticos, que a su vez podrían estar asociados con un proceso de senescencia, o bien puede explicarse una disminución de las clorofilas a expensas de una acumulación de carotenoides como respuesta al estrés inducido por el campo magnético,

situación similar a la que se describe para el estrés por aumento de la intensidad de la luz (Torzillo *et al.*, 2005; Göksan y Ak, 2006). Los valores de clorofilas totales obtenidos para los controles en la fase exponencial tardía (11^{no} día) (58.42 ± 4.0 pg cel⁻¹) fueron superiores a los que refieren otros autores (Cifuentes *et al.*, 2003; Göksan y Ak, 2006).

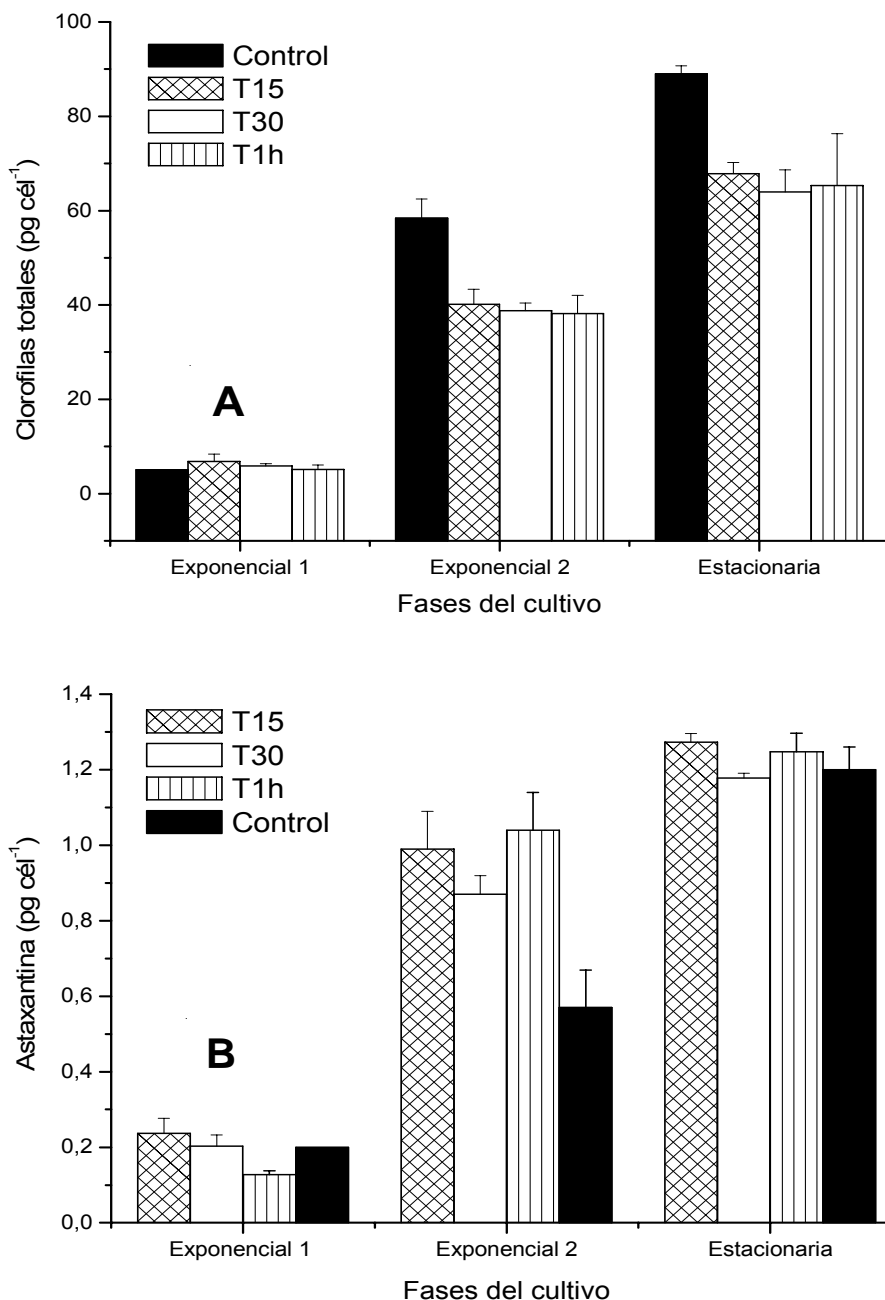


Figura 4. Variación de la concentración de clorofilas totales (pg cel⁻¹) (A) y astaxantina (B) para células en cultivo *H. pluvialis* expuestas a un campo magnético de 0.03T durante diferentes períodos de tiempo: 15 min (T15), 30 min (T30) y 1 h (T1h) y controles no expuestos al campo magnético, en diferentes fases de crecimiento: Exponencial temprana (1), 7^{mo} día y tardía (2), 11^{no} día y Estacionaria (día 18). (Se grafican los valores medios n=3, las líneas verticales representan el EE).

En experimentos realizados con cloroplastos de espinaca se explica el aumento de la emisión luminiscente de la clorofila *a*, tras una exposición a un campo magnético de 0.3T (Sonneveld *et al.*, 1980). Los autores explican dicho proceso en términos de mecanismos de pares de radicales. Esto podría apuntar hacia la contribución del campo magnético a la eficiencia de un proceso energético y no sólo habría que traducir sus efectos en estimulación o inhibición de la síntesis de determinado metabolito.

Al hacer un análisis de la concentración de astaxantina por célula, esta no parece afectarse significativamente con el efecto del campo magnético en la fase estacionaria del crecimiento ($p < 0.05$), si bien es notable la diferencia en la fase exponencial tardía (11^{no} día). Existieron diferencias entre el control (0.57 ± 0.0 pg cel⁻¹) y los cultivos expuestos al campo magnético (0.87 - 1.04 pg cel⁻¹) ($p < 0.05$). Este comportamiento podría estar asociado a la resiliencia de la especie, la que se estabilizaría metabólicamente hacia la fase estacionaria, de la perturbación ocasionada por el campo magnético.

Efecto del campo magnético (0.03T) sobre cultivos de *H. pluvialis* sin nitrógeno

En el caso de los cultivos sin nitrógeno (Figura 5) existió una clara evidencia del efecto del campo magnético. Su aplicación permitió mayor crecimiento celular ($46.5 \pm 1 \times 10^4$ cel.ml⁻¹) al

comparar con los valores obtenidos en cultivos controles, no expuestos al campo magnético ($38.66 \pm 0.01 \times 10^4$ cel.ml⁻¹) ($p < 0.01$), lo que puede atribuirse a un efecto de redistribución del nitrógeno celular.

Al analizar la apariencia de las células en cultivo se observó una diferencia cualitativa importante. Mientras las expuestas al campo magnético tenían un patrón de coloración verde rojizo, las células de los cultivos no expuestos al campo magnético (controles) eran completamente rojas, lo que sin dudas es una evidencia de una redistribución del nitrógeno hacia la síntesis de clorofilas, en las primeras. La relación de la síntesis de clorofilas con la luz y la concentración de nitrógeno es bien conocida (Piorreck *et al.*, 1984); sin embargo, poco hay estudiado sobre el metabolismo de estos microorganismos bajo el efecto de campos magnéticos. El nitrógeno es necesario para la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos; su déficit conduce desde el punto de vista metabólico a la acumulación de grandes cantidades de sustancias de reserva (Becker, 1994) y a una redistribución del nitrógeno celular que conlleva a la degradación de la reserva de aminoácidos y otros compuestos ricos en nitrógeno como las clorofilas (Hipkin y Syrett, 1977). En ausencia de nitrato cesa la división celular (Ben-Amotz y Avron, 1983); sin embargo, en estos experimentos se constata un efecto modulador del campo magnético sobre el metabolismo de células de *H. pluvialis* privadas de la fuente de nitrógeno.

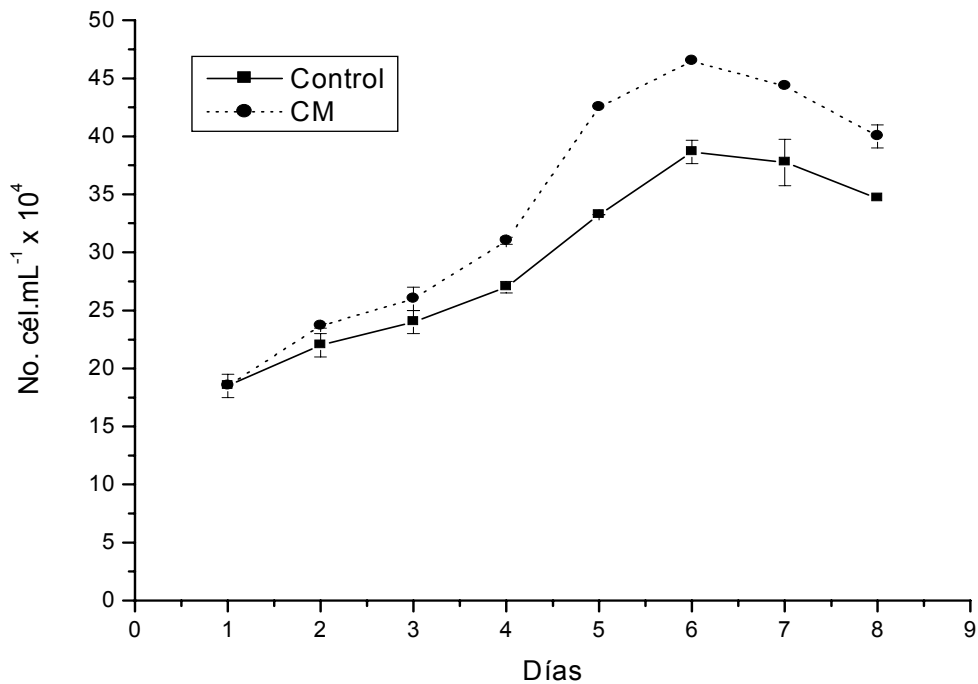


Figura 5. Cinética de cultivos de *H. pluvialis* desarrollados en medios de cultivo sin nitrógeno y expuestos a un campo magnético de 0.03T (CM) y control (sin el efecto del campo magnético). (Se grafican los valores medios $n=3$, las líneas verticales representan el EE).

Respecto a la concentración de clorofilas, las diferencias fueron significativas a partir del 6^o día de cultivo (Figura 6). Mientras que en los controles esta declina, en los cultivos expuestos al campo magnético se mantuvo relativamente constante ($p < 0.05$). La respuesta de los controles ha sido descrita previamente por Boussiba *et al.* (1999); en ausencia de nitrógeno la acumulación de astaxantina está acompañada por degradación de las clorofilas. Sin embargo, resulta relevante para los hallazgos experimentales del presente trabajo, que el campo magnético contribuya a que la concentración de clorofilas se mantenga por encima de los 20 $\text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$, pues por debajo de este valor, la acumulación de astaxantina cesa. La concentración de astaxantina aumentó significativamente ($p < 0.05$) con el tiempo de cultivo. Se ha descrito que la ausencia de nitrógeno es una vía para inducir su síntesis, además del aumento de la densidad de flujo fotónico, de la concentración de sales (Grunewald *et al.*, 1997; Cifuentes *et al.*, 2003; Orosa *et al.*, 2005; Vidhyavathi *et al.*, 2008) y el uso de acetato, en cultivos mixotróficos (Orosa *et al.*, 2001a).

Según los resultados, la acumulación de clorofilas en ausencia de nitrógeno, depende más del tiempo de cultivo ($p < 0.05$) que del efecto del campo magnético ($p < 0.1$), siendo este último un factor que más bien disminuye su acumulación si se aplica de forma permanente. Por otra parte, no existieron variaciones significativas ($p < 0.05$) en la concentración de astaxantina entre los cultivos controles y expuestos al campo magnético. Sin embargo, esta fue discretamente menor en los cultivos expuestos, lo que podría formar parte de la estrategia de respuesta de *H. pluvialis* al estrés. Es muy probable que al redireccionarse el nitrógeno a la síntesis de clorofilas y el mantenimiento o aumento del número de células en presencia del campo magnético, este no pueda ser usado para la síntesis de astaxantina que requiere nitrógeno (Orosa *et al.*, 2001a). Se necesita una síntesis proteica que soporte la acumulación masiva del pigmento, la cual depende del nitrógeno intracelular conservado como RuBisCo. Ello pudiera explicar la supervivencia de los controles con menores densidades celulares y una mayor acumulación de astaxantina.

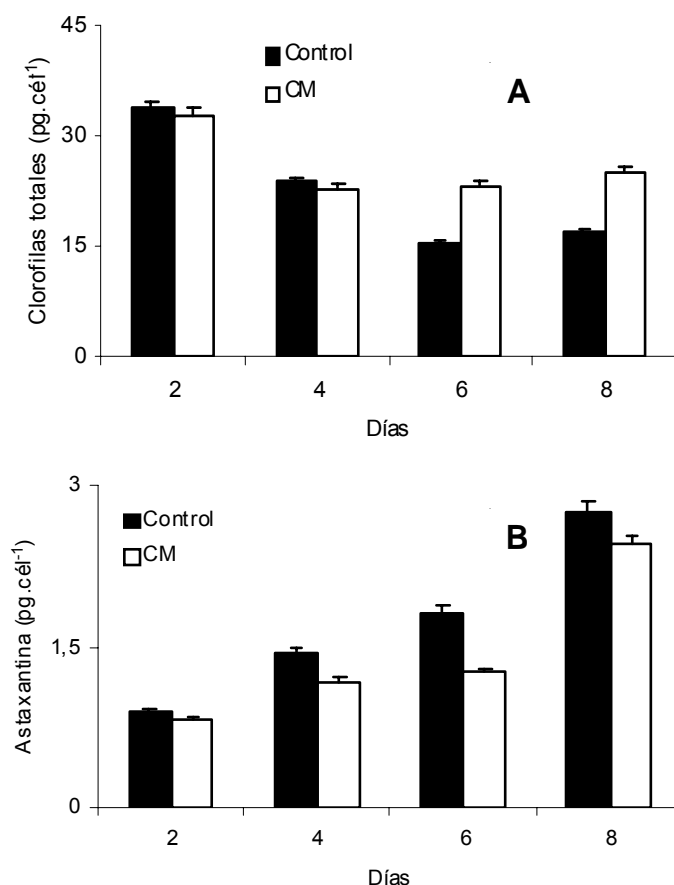


Figura 6. Variación de la concentración pigmentaria: de clorofilas (izquierda) y astaxantina (derecha), en cultivos de *H. pluvialis* desarrollados en medios de cultivo sin nitrógeno y expuestos a la acción permanente de un campo magnético de 0.03T (CM) y control (sin campo magnético). (Se grafican los valores medios, $n=3$, las líneas verticales representan el EE).

La acumulación de astaxantina a nivel celular sucede después de la iniciación de un estrés oxidativo y alcanza su nivel máximo celular después de seis o más días de inducido dicho estrés; la primera respuesta involucra un proceso de defensa múltiple enzimática que juega un papel crítico en situaciones de estrés y también durante la transición temprana de células vegetativas a hematoquistes (Sheng-Bing *et al.*, 2004). A medida que el desarrollo de los quistes continúa, la intensiva respuesta inicial mediada por enzimas, es mayormente remplazada en los quistes maduros por la acumulación de la molécula antioxidante.

La evaluación del índice Q en los cultivos limitados por nitrógeno muestra que hay un aumento significativo de los quistes en los controles (no expuestos al campo magnético) ($p < 0.05$); sin embargo, la viabilidad, aún en ausencia de nitrógeno es mayor en los cultivos expuestos al campo magnético (Figura 7). Se favoreció la presencia de células móviles e incluso, la división celular, lo que fue corroborado con observaciones al microscopio óptico.

Goodwin y Jamikorn (1954), explican que la formación de quistes y la acumulación de astaxantina es resultado de la carencia de nitrógeno disponible. Por tanto, el campo magnético puede inducir un proceso que permite disponer del nitrógeno a nivel subcelular, lo que explicaría los resultados. Por su parte, Sheng-Bing *et al.* (2004) ofrecen evidencias directas de la existencia de un mecanismo de defensa antioxidativa múltiple, espacial y temporalmente regulado, para la protección celular en células de *H. pluvialis* contra

el estrés oxidativo, y por tanto, de la complejidad de una respuesta ante el estrés.

El campo magnético estimula el crecimiento, la síntesis de clorofilas y la viabilidad en células de *H. pluvialis* cultivadas sin nitrógeno, por lo que parece operar directamente sobre la eficiencia fotosintética mediante una modulación de la respuesta ante el estrés, sin excluir la posibilidad de que redirija el nitrógeno celular hacia la síntesis de clorofilas. Por otra parte, induce un aumento de la matriz extracelular de aproximadamente 6 μm , respecto a las células control, con repercusión en su morfología (Figura 8).

La formación de la estructura trilaminar de algenano en células quiescentes de *Haematococcus* se ha relacionado con el incremento a la resistencia a la radiación ultravioleta (Kobayashi y Okada, 2000), considerando esta como una respuesta al estrés. La matriz de *H. pluvialis* consiste básicamente en glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, es multilaminada y está conformada por elementos granulares y cristalinos, esta confiere a la célula una extraordinaria resistencia a daños químicos y mecánicos (Hagen *et al.*, 2002). El campo magnético podría favorecer su estructuración, como respuesta al estrés. Esta puede ser una respuesta celular que contrarreste el aumento de la permeabilidad producido por el campo magnético (Koch *et al.*, 2003). Esta además, es otra ruta de utilización de nitrógeno celular, no disponible entonces para la síntesis de astaxantina en condiciones de carencia de nitrógeno, sin exposición al campo magnético.

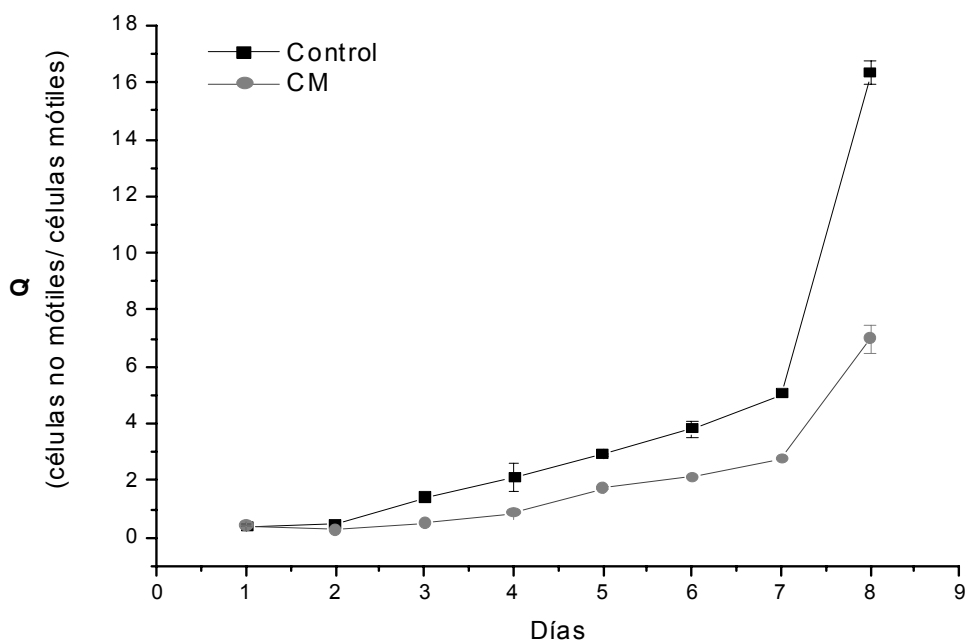


Figura 7. Variaciones del índice Q en cultivos de *H. pluvialis* sin nitrógeno, con y sin el efecto de un CM de 0.03T. (Se grafican los valores medios $n=3$, las líneas verticales representan el EE).

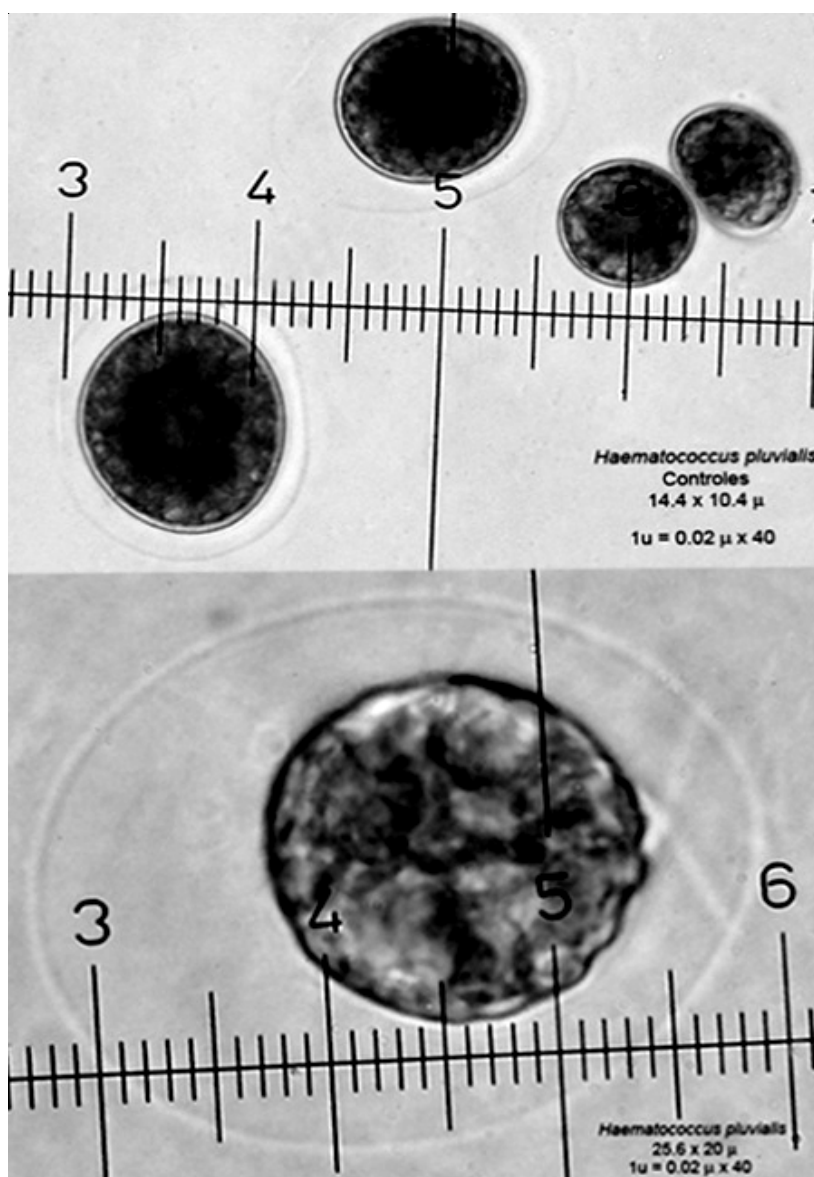


Figura 8. Variaciones morfológicas de células en cultivo de *H. pluvialis* expuestas a un campo magnético de 0.03T (abajo) y control, con cultivos no expuestos al campo magnético (arriba).

CONCLUSIONES

Fue posible determinar que el efecto del campo magnético depende de su protocolo de aplicación y el estado nutricional de los cultivos, pero de manera general un campo magnético de 0.03T afecta el crecimiento, la viabilidad celular y la síntesis de pigmentos en *H. pluvialis* y parece operar directamente sobre la eficiencia fotosintética mediante una modulación de la respuesta ante el estrés.

A partir de los resultados, sería importante considerar al campo magnético como agente promotor del crecimiento en la fase de inducción de acumulación de astaxantina, aspecto que hasta hoy constituye una problemática para la producción a gran escala,

puesto que este proceso compromete el crecimiento celular. Este trabajo ofrece evidencias de una respuesta compleja ante el estrés y del potencial para el desarrollo de cultivos comerciales de la cepa de *H. pluvialis* estudiada.

REFERENCIAS

- Becker, E W (1994) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge
- Ben-Amotz, A, Avron M (1983) On the factors which determine massive-carotene accumulation and its industrial potential. *Annual Review of Microbiology* 37: 95-119
- Boussiba, S (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* 108: 111-117

- Boussiba, S, Bing W, Yuan J-P, Zarka A, Feng C (1999) Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters* 21: 601-604
- Brinda, BR, Sarada R, Sandesh Kamath B, Ravishankar GA (2004) Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* - cultural and regulatory aspects. *Current Science* 87: 1290-1295
- Bubrick, P (1991) Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresource Technology* 38: 237-239
- Chaumont, D, Thèpenier C (1995) Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. *J. Applied Phycology* 7: 529-537
- Cifuentes, A, González M, Vargas S, Hoeneisen M, González N (2003) Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biology Research* 36: 343-357
- Delay, MC, Imamoglu, E, Demirel Z (2007) Agricultural fertilizers as economical alternative for cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *J Microbiology Biotechnology* 17: 393-7
- Davis, BH (1976) Carotenoids. En: TW Goodwin (ed.) *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. 2, pp. 38-165. Academy Press, London
- Del Río, E, Ación F, García-Malea M, Rivas J, Molina-Grima E, Guerrero M (2008) Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology & Bioengineering* 100 (2): 397-402
- Elahee, KB, Poinapen D (2006) Effects of static magnetic fields on growth of *Paramecium caudatum*. *Bioelectromagnetics* 27: 26-34
- García-Malea, M, Ación F, Del Río E, Fernández J, Cerón M, Guerrero M, Molina-Grima E (2009) Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: Taking the one-step system outdoors. *Biotechnology & Bioenergy* 102 (2): 651-7
- Göksan, T, Ak I (2006) Vegetative growth of the green alga *Haematococcus pluvialis* cultivated on different light-path lengths. *Asian Journal of Plant Sciences* 5: 455-460
- Gómez, L, Pérez García N, García Rodríguez JL, Willson J (2007) Cultivo acelerado de microalgas con el uso de un CM estático. *Revista Tecnología Química, Número Especial*
- Goodwin, T W, Jamikorn M (1954) Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochemistry. J.* 57: 376-381
- Grunewald, K, Hagen C, Braune W (1997) Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*. *European. J. of Phycology* 32: 387-392
- Guerin, M, Huntley ME, Olaizola M (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 21: 210-216
- Hagen, C, Siegmund S, Braune W (2002) Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European J. Phycology* 37: 217-226
- Hipkin, CR, Syrett PJ (1977) Some effects of nitrogen-starvation on nitrogen and carbohydrate metabolism in *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* 133: 209-214
- Kamath, B, Srikanta B, Dharmesh S, Sarada R, Ravishankar G (2008) Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *European J of Pharmacology* 590: 387-95
- Kang, C, Sim S (2008) Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnology Letters* 30: 441-4
- Kobayashi, M, Kakizono T, Nagai S (1991) Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. of Fermentation Bioengineering* 71: 335-339
- Kobayashi, M, Kakizono T, Nagai S (1993) Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 867-873
- Kobayashi, M, Okada T (2000) Protective role of astaxanthin against UV B irradiation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters* 22: 177-181
- Koch, CL M, Sommarin M, Persson BR, Salford LG, Eberhardt JL (2003) Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. *Bioelectromagnetics* 24: 395-402
- Li, ZY, Guo SY, Li L, Cai MY (2007) Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. *Bioresource Technology* 98: 700-705
- Nozaki, H (2003) Flagellate green algae. En: *Freshwater algae of North America*, J D Wehr, R G Sheath (Eds), NY, pp. 224-252
- Olaizola, M (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. of Applied Phycology* 12: 499-506
- OMS (2008) Los campos electromagnéticos: Normas y directrices. Organización Mundial de la Salud
- Orosa, M, Franqueira, D, Cid A, Abalde J (2001a) Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnology Letters* 23: 373-378
- Orosa, M, Franqueira D, Cid A, Abalde J (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 96: 373-378
- Orosa, M, Valero JF, Herrero C, Abalde J (2001b) Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnology Letters* 23: 1079-1085
- Piorreck, M, Baasch KH, Pohl P (1984) Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23: 207-216
- Sarada, R, Bhattacharya S, Ravishankar GA (2002) Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World J. of Microbiology Biotechnology* 18: 517-521
- Sedmak, JJ, Weerasinghe DK, Jolly SO (1990) Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology & Technology* 4: 107-112
- Sheng-Bing, W, Fen C, Sommerfield M, Quian H (2004) Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta* 220: 17-29
- Singh, SS, Tiwari SP, Abraham J, Rai S, Rai AK (1994) Magnetobiological effects on a cyanobacterium *Anabena doliolum*. *Electro Magnetobiology* 13: 227-235
- Sonneveld, A, Duysens LNM, Moerdijk A (1980) Magnetic field-induced increase in chlorophyll a delayed fluorescence of photosystem II: A 100- to 200-ns component between 4.2

- and 300 K (photosynthesis/primary acceptor W/ luminescence/radical pair mechanism/primary donor P680). Proceedings of National Academy Science USA 77: 5889-5893
- Starr, RC, Zeikus JA (1987) UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. J. of Phycoogy. 29: 1-106
- Stewart, J, Lignell A, Pettersson A, Elfving E, Soni M (2008) Safety assessment of astaxanthin-rich microalgae biomass: Acute and subchronic toxicity studies in rats. Food Chemistry Toxicology 46: 3030-6
- Thompson, RH, Wujek DE (1989) *Haematococcus carocellus* sp. Nov. (*Haematococcaceae*, *Chlorophyta*) from the United States. Phycologia 28: 268-270
- Torzillo, GT, Goksan T, Isik O, Gokpinar (2005) Photon irradiance required to support optimal growth and interrelation between irradiance and pigment composition in the green alga *Haematococcus pluvialis*. European J. Phycology 40: 233-240
- Triki, A, Maillard P, Gudin C (1997) Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (*Volvocales*, *Chlorophyta*). Phycologia 36: 190-194
- Vidhyavathi, R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar G (2008) Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. J. of Experimental Botanic 59: 1409-18
- Zhang, X, Pan L, Wei X, Gao H, Liu J (2007) Impact of astaxanthin-enriched algal powder of *Haematococcus pluvialis* on memory improvement in BALB/c mice. Environmental Geochemical Health 29: 483-9
- Zhi-Yong, L, Si-Yuan G, Lin L, Miao-Yan C (2007) Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. Bioresource Technology 98 700-705