

Análisis de la radiación óptica sobre cianobacterias en foto-biorreactores

F. Fanjul-Vélez, L. Arévalo-Díaz, J. L. Arce-Diego

Grupo de Técnicas Ópticas Aplicadas, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av. de los Castros s/n, 39005 Santander (Cantabria), España, fanjulf@unican.es, arcedj@unican.es

Resumen

La biotecnología es un campo de investigación y trabajo con gran potencialidad. Sus aplicaciones abarcan desde la comprensión de los ciclos vitales, la mejora de procesos agrícolas o ambientales, hasta las aplicaciones de producción biológica o sustancias de interés médico. En el caso particular de las cianobacterias, estos organismos presentan la particularidad de generar oxígeno y biomasa a partir de radiación óptica y CO₂, fundamentalmente, pero también son susceptibles de generar otras sustancias o principios activos de interés. Uno de los aspectos cruciales del proceso está focalizado en el crecimiento óptimo de las cianobacterias. El cultivo de estos organismos se realiza en foto-biorreactores, capaces de lograr condiciones de temperatura, pH, saturación de CO₂ e iluminación óptica controlados. El influjo de la radiación óptica es fundamental en el proceso, y depende del tipo y duración de la iluminación, así como del propio proceso de crecimiento. El propio procedimiento de medida del crecimiento del cultivo de forma dinámica, clave para la delimitación de la eficiencia de producción, suele hacerse también ópticamente. En este trabajo se analiza la distribución de radiación óptica en foto-biorreactores con cianobacterias, con objeto de conocer los parámetros que influyen en el crecimiento de las mismas. Para ello se emplea un modelo de propagación óptica en medios turbios, y se analizan las propiedades ópticas de los cultivos. Los resultados muestran una elevada dependencia de la distribución espacial de radiación en función de la longitud de onda, el radio del haz, el perfil espacial o la irradiancia. Estos resultados permiten elegir los parámetros ópticos e interpretar adecuadamente las medidas de concentración, así como incrementar la eficiencia del proceso.

1. Introducción

Las aplicaciones de la biotecnología están en constante crecimiento en los últimos tiempos. Estas aplicaciones abarcan desde problemas agrícolas, bioquímicos o incluso biomédicos. En particular, existen organismos capaces de producir elementos tan valiosos como combustibles, fármacos, alimentos u oxígeno, entre otros. La consecución de producciones eficientes de este tipo de elementos depende del conocimiento preciso de los procesos biológicos involucrados. Con ello es posible tratar de controlar y fomentar la eficiencia en el proceso de crecimiento y producción de sustancias de interés.

De entre los múltiples tipos de microorganismos susceptibles de aplicabilidad biomédica, las cianobacterias presentan la particularidad de producir oxígeno y biomasa, entre otros, a partir de CO₂ y radiación óptica. Uno de sus aplicaciones potenciales está relacionada con el suministro de elementos básicos para la habitabilidad humana en

entornos hostiles, en esencia alimento y un entorno respirable. El conocimiento de los factores que maximizan la producción de elementos de interés es crucial [1]. Un control adecuado de los mismos derivaría en un incremento de la eficiencia de producción.

Para llevar a cabo el crecimiento de microorganismos y, en consecuencia, la producción de los elementos de interés, se utilizan dispositivos complejos llamados biorreactores [2]. El diseño de estos dispositivos está encaminado a potenciar el crecimiento de microorganismos, cianobacterias en este caso. Para ello presentan la capacidad de suministrar, de forma controlada, todos los elementos que precisan. Estos elementos dependen del tipo particular de microorganismo objetivo. En el caso de las cianobacterias, a los elementos habituales se añade el gran influjo de la radiación óptica, que es esencial para su crecimiento. Es por ello que los dispositivos de crecimiento reciben el nombre de foto-biorreactores. El diseño del foto-biorreactor es fundamental para el proceso de producción. Este diseño lleva aparejada la iluminación óptica, así como el sistema de medida del crecimiento de las cianobacterias. La tipología y características ópticas de las cianobacterias, así como las de la fuente óptica, presentan una gran influencia en los procesos anteriormente mencionados y, en consecuencia, en la eficiencia de producción. Estos términos no suelen considerarse en el diseño de foto-biorreactores actuales.

En este trabajo se lleva a cabo un análisis de la distribución de radiación óptica en un foto-biorreactor con cianobacterias. Esta distribución está relacionada con la estimación del crecimiento del cultivo, así como con la eficacia del crecimiento. La morfología de las cianobacterias presenta una gran influencia en el esparcimiento de la radiación. Se consideran diferentes concentraciones de cianobacterias, así como diferentes perfiles espaciales e irradiancias. Las propiedades ópticas de las cianobacterias definen su influencia en la distribución de radiación óptica. Los resultados contribuirían a un adecuado diseño del foto-biorreactor, para conseguir mejorar la eficacia del proceso, así como a al establecimiento de la relación entre la radiación óptica y la concentración de cianobacterias. Esto permitiría establecer las condiciones óptimas de las fuentes ópticas para maximizar el rendimiento.

2. Parámetros fundamentales de foto-biorreactores

El diseño de los foto-biorreactores conlleva la consideración de un gran número de factores. Tal y como se ha referido anteriormente, uno de los más significativos es la radiación óptica. Existen foto-biorreactores que trabajan con luz solar, pero en este caso el control de la radiación es bastante más complicado. Esto se debe a que es difícil asegurar que la exposición es uniforme en todo el conjunto de microorganismos, con irradiaciones en áreas pequeñas en comparación con el volumen afectado, baja transferencia de masa orgánica y, por ende, ineficiencia. Lo más habitual para cianobacterias es el uso de fuentes de tipo LED o fluorescentes para el crecimiento. La irradiación es fuertemente dependiente de las dimensiones del foto-biorreactor, de la concentración de cianobacterias y de otros factores como la posible agregación laminar del cultivo. Una iluminación inhomogénea hace que algunas cianobacterias detengan su proceso de crecimiento. El espectro de la señal óptica es también altamente relevante en el proceso. Habitualmente la mayor parte de las cianobacterias necesitan iluminaciones en el entorno del visible, entre unos 400 y 700 nm. La magnitud de la irradiancia influye también en gran medida en el sistema. Si la irradiancia es escasa, el crecimiento se ralentiza, mientras que si su magnitud es demasiado elevada, se puede producir foto-inhibición o foto-destrucción.

Uno de los efectos fundamentales que es necesario tener en cuenta es el del apantallamiento. Se produce como consecuencia de la acumulación de cianobacterias en la superficie del recipiente de cultivo, y en consecuencia la limitación de irradiación a cianobacterias situadas a mayores profundidades [3]. Para solventar este problema, los foto-biorreactores incluyen un sistema de agitación del cultivo. Este procedimiento evita el apantallamiento, pero a costa de inducir una exposición discontinua a la radiación. Dependiendo de sus características, puede ser necesario tener este efecto en cuenta. Las cianobacterias necesitan también de un suministro de CO₂ para su crecimiento. Habitualmente se introduce en el sistema mediante inyección de gas desde la parte inferior de la muestra. El control de la cantidad y concentración de CO₂ es un parámetro de gran relevancia en la eficiencia del proceso de crecimiento. Asimismo el pH de la solución debe ser controlado para generar condiciones de crecimiento apropiadas. En definitiva, un foto-biorreactor apropiado debería proporcionar una distribución óptica reducida, una alta densidad de microorganismos, elevado ciclo de luz-oscuridad, muestras de tamaño reducido, aporte continuo de CO₂, temperatura constante y valor de pH óptimo.

La base de la producción de elementos por parte de las cianobacterias es la fotosíntesis oxigénica [1]. En esta reacción el agua se emplea como donadora de electrones, lo que en combinación con el CO₂ da lugar a la liberación de oxígeno. El proceso fotosintético se puede dividir en dos fases, una dependiente de la radiación óptica y otra independiente. La primera convierte la radiación óptica en energía química. Esta radiación es capturada por pigmentos fotoactivos, particularmente de tipo clorofila y

carotenoide [2]. El suministro de la energía generada a las proteínas se lleva a cabo por medio del fotosistema I (centrado a 700 nm) y del fotosistema II (centrado a 680 nm). Esta fase genera oxígeno. En la fase de oscuridad las nuevas sustancias producidas están implicadas en la generación de compuestos orgánicos, como la glucosa, en el llamado ciclo de Calvin.

La eficiencia fotosintética está controlada mediante la irradiancia, la longitud de onda [4,5], la temperatura (un incremento de unos 10°C da como resultado habitual doblar la eficiencia, siempre por debajo del umbral de daño), la concentración de CO₂ y la concentración de oxígeno. Las cianobacterias suelen contener clorofila tipo a. Este hecho les da un color característico, azul o verde, aunque también existen de color rojo. Lo que suele suceder es que la luz visible se transfiere al centro de reacción de la clorofila de tipo a.

Las consideraciones de esta sección ponen de manifiesto la alta relevancia de la radiación óptica sobre las cianobacterias. En particular, la distribución espacial, la irradiancia o la longitud de onda influyen enormemente en el proceso.

3. Análisis de la propagación óptica

En esta sección se trata de analizar la propagación óptica en cultivos de cianobacterias. Para ello uno de los aspectos críticos tiene que ver con la variada morfología de las mismas, que van desde organismos unicelulares hasta especímenes filamentosos. Esta variedad tiene una gran repercusión en las propiedades de esparcimiento, principalmente, y en consecuencia en la distribución espacial de radiación.

La distribución espacial de radiación se puede estimar mediante la ecuación del Transporte de la Radiación:

$$\hat{s} \cdot \nabla I(r, \hat{s}) = -(\mu_a + \mu_s)I(r, \hat{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(\hat{s} \cdot \hat{s}') I(r, \hat{s}') d\Omega' \quad (1)$$

En esta ecuación $I(r, \hat{s})$ es la intensidad específica. La radiación se considera en un punto espacial de vector de posición r , y sigue la dirección del vector \hat{s} . Los eventos de esparcimiento se estiman a partir de la llamada función de fase de esparcimiento $p(\hat{s} \cdot \hat{s}')$. La radiación óptica proviene de la dirección \hat{s}' y se redirecciona según el vector \hat{s} . μ_a y μ_s son los coeficientes de absorción y esparcimiento, respectivamente.

La ecuación del transporte de la radiación puede tratar de resolverse de manera analítica. Los métodos al respecto suelen emplear aproximaciones en casos límite, tales como las que asumen absorción dominante o la aproximación de difusión. La validez de estas aproximaciones depende de la importancia relativa de los eventos de absorción y esparcimiento en un tejido biológico específico. Para evitar esto, existe la posibilidad de intentar resolver numéricamente la ecuación anterior. El análisis numérico se ha empleado en numerosos problemas modelados mediante ecuaciones diferenciales. En el caso concreto de

la ecuación del transporte de la radiación, el método de Monte Carlo posee una demostrada aplicabilidad y precisión, comparado con las soluciones analíticas [6].

El carácter pseudoaleatorio del método se consigue mediante un análisis matemático probabilístico, de tal forma que a partir de números distribuidos uniformemente entre 0 y 1, se llega a distribuciones con la función de densidad requerida. La radiación óptica se considera como una secuencia de fotones, cuyo número modula la exactitud de la solución obtenida. Tras el lanzamiento de un fotón, se calcula su trayectoria, según los eventos de esparcimiento y absorción. En fuentes ópticas es habitual que existe simetría cilíndrica con respecto al eje central del haz, aunque el análisis sea tridimensional. La representación final consiste en un plano con las dimensiones radial y en profundidad, en el interior del tejido biológico. Las dimensiones de la rejilla de trabajo están directamente relacionadas con la carga computacional y la exactitud espacial de la solución.

Con este método se pueden obtener resultados diversos, como por ejemplo la absorción en cada celda espacial de la rejilla. También es posible obtener la fluencia, la reflectancia y la transmitancia en función de la posición radial y el ángulo de observación. Diferentes conformaciones de haz espacial se pueden tener en cuenta mediante operaciones de convolución. Es necesario definir las dimensiones y características ópticas de cada capa del elemento biológico de interés. Los parámetros ópticos son el índice de refracción, n , el coeficiente de absorción, μ_a , el coeficiente de esparcimiento μ_s , y la anisotropía de esparcimiento, g . Este último parámetro también se conoce como el coseno promedio de esparcimiento, y se relaciona con la función de fase de esparcimiento mediante la siguiente expresión:

$$g = \frac{\int_{4\pi} p(\hat{s} \cdot \hat{s}') \hat{s} \cdot \hat{s}' d\Omega'}{\int_{4\pi} p(\hat{s} \cdot \hat{s}') d\Omega'} = \frac{1}{4\pi W_o} \int_{4\pi} p(\hat{s} \cdot \hat{s}') \hat{s} \cdot \hat{s}' d\Omega' = \frac{1}{2W_o} \int_{4\pi} p(\cos \theta) \cos \theta \sin \theta d\theta \quad (2)$$

En esta ecuación el albedo se define como:

$$W_o = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\hat{s} \cdot \hat{s}') d\Omega' = \frac{\sigma_s}{\sigma_a + \sigma_s} = \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (3)$$

El coseno promedio de esparcimiento indica cuál es la probabilidad de que los fotones sean esparcidos en determinadas direcciones. Así, $g=0$ significa que todas las direcciones son equiprobables. Un parámetro g mayor que 0 manifiesta una tendencia al esparcimiento hacia adelante, y viceversa. El albedo da como resultado una estimación de la importancia relativa entre la absorción y el esparcimiento en la aplicación de interés.

4. Resultados y discusión

La problemática de la distribución de radiación en cultivos de cianobacterias, influye en el diseño del foto-biorreactor construido. Las propiedades ópticas, fundamentalmente coeficientes de absorción y esparcimiento, anisotropía de

esparcimiento e índice de refracción, fueron obtenidas para diferentes concentraciones de *A. cylindrica* [7]. Se consideran diferentes longitudes de onda en el rango visible, debido a la sensibilidad de las cianobacterias en ese rango, en particular 405, 490, 530, 625 y 730 nm. Las concentraciones del análisis son tres, 0.202 Kg/m³, 0.296 Kg/m³ y 0.431 Kg/m³, habituales en cultivos. La distribución espacial del haz se hace variar entre un perfil gaussiano y de tipo top-hat, que se suelen emplear en fuentes ópticas [8]. Los radios de estos haces oscilan entre 0.1 y 0.5 cm, con objeto de provocar variaciones de irradiancia, dentro del rango acorde a las dimensiones de los cultivos. La geometría del foto-biorreactor para diseñar hace que tenga sentido asumir simetría cilíndrica, y un grosor del dispositivo de cultivo de 1 cm.

Con estos datos es posible obtener distribuciones espaciales de radiación. Una distribución de relevancia es la de la radiación que atraviesa el cultivo (transmitida), y que serviría para estimar su concentración, además de la iluminación del proceso fotosintético. La Figura 1 muestra un ejemplo de esta distribución que atraviesa la muestra. En esta figura se puede apreciar la gran influencia que la longitud de onda tiene en la distribución espacial del haz.

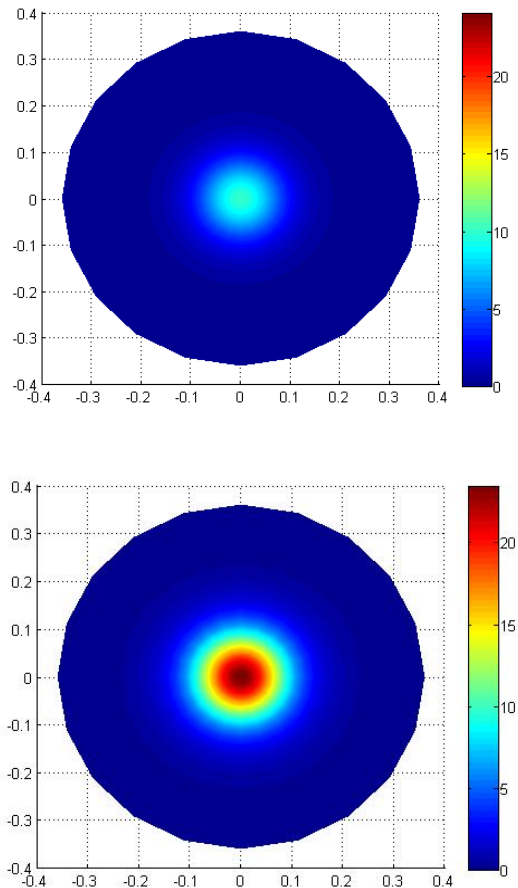


Figura 1. Distribución espacial de la radiación transmitida por el cultivo de cianobacterias en el foto-biorreactor, con una concentración de 0.202 kg/m³, haz gaussiano de 0.1 cm de radio eficaz, y a dos longitudes de onda diferentes: 530 nm (arriba) y 730 nm (abajo).

La absorción óptica es bastante superior a 530 nm, cuando se compara con la que existe a 730 nm. Este hecho origina una potencia inferior recibida en transmisión, lo que podría dificultar la recepción de una señal de potencia suficiente para estimar la concentración. El esparcimiento, sin embargo, es similar a ambas longitudes de onda, con lo que la delimitación espacial de esa radiación se circunscribe a un área no muy diferente.

El parámetro de la fluencia total transmitida en función de la longitud de onda es altamente significativo para el análisis efectuado y, por ende, para el diseño del fotobiorreactor. Para ello es necesario integrar las contribuciones de irradiancia transmitida espacialmente, teniendo en cuenta la geometría del problema. La Figura 2, a modo de ejemplo, muestra esta fluencia en función de la longitud de onda para una concentración de cianobacterias de 0.431 kg/m^3 .

En esta Figura 2 se aprecia cómo existen longitudes de onda de máxima absorción, como por ejemplo a 405 y 625 nm, frente a otras de mínima absorción a 730 nm. Esto está en relación con la afirmación que se realizó en secciones anteriores, relativa a la absorción por parte de las cianobacterias de radiación óptica en el rango del visible, entre 400 y 700 nm. Para una longitud de onda por encima de ese rango, a 730 nm, la absorción decae en gran medida. Bajo el punto de vista de la iluminación del cultivo, una baja absorción implica una baja eficiencia de aporte de energía y, por tanto, baja tasa de generación y crecimiento. Sin embargo, si lo que se considera es un sistema de medida del crecimiento del cultivo, es preferible contar con longitudes de onda de baja absorción, dado que de esta forma se conseguirá un mayor nivel de señal en detección, además de no influir en el crecimiento del cultivo. La tendencia es de absorción descendente con la longitud de onda, con la excepción de la longitud de onda de 625 nm, que supone un punto de inflexión.

5. Conclusiones

Se ha analizado la distribución de radiación óptica sobre diferentes concentraciones de cianobacterias en un fotobiorreactor específico. Se han considerado diferentes perfiles espaciales de haz, radios eficaces y longitudes de onda.

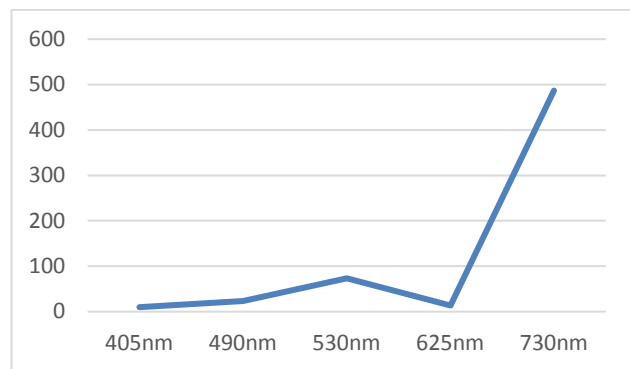


Figura 2. Fluencia óptica total transmitida en función de la longitud de onda para una concentración de 0.431 kg/m^3 .

El análisis se ha llevado a cabo mediante la ecuación del transporte de la radiación, y las propiedades de absorción y esparcimiento de *A. cylindrica*. Los resultados muestran la gran influencia de la absorción con la longitud de onda, así como del esparcimiento, y permiten concluir que una radiación por encima del rango visible, a 730 nm, es preferible para el sistema de monitorización del crecimiento de cianobacterias de este tipo. En términos de iluminación, y como se preveía a partir del proceso fotosintético, es preferible maximizar la absorción con longitudes de onda en la rango visible. Estos resultados contribuyen al adecuado diseño y construcción de fotobiorreactores con monitorización de crecimiento y maximización de eficacia de producción de sustancias.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad de España “Nuevas fases activas en nano-óxidos de metales de transición y tierras raras estabilizadas a alta presión” (MAT2015-69508-P), cofinanciado con fondos FEDER, y por la Fundación San Cándido.

Referencias

- [1] Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta*, vol 1020, 1990, pp 1–24 (ISSN: 0006-3002).
- [2] Wojtasiewicz B, Stoń-Egiert, J. Bio-optical characterization of selected cyanobacteria strains present in marine and freshwater ecosystems. *J Appl Phycol*, vol 28(4), 2015, pp 2299–2314 (ISSN: 0921-8971).
- [3] Salas-García I, Fanjul-Vélez, F, Arce-Diego, J. L. Photosensitizer absorption coefficient modelling and necrosis prediction during photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol 114, 2012, pp 79–86 (ISSN: 1011-1344).
- [4] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Superficial radially-resolved fluorescence and three-dimensional photochemical time-dependent model for Photodynamic Therapy. *Optics Letters*, vol 39, 2014, pp 1845–1848 (ISSN: 0146-9592).
- [5] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego J. L. Spatial photosensitizer fluorescence emission predictive analysis for photodynamic therapy monitoring applied to a skin disease. *Optics Communications*, vol 285, 2012, pp 1581–1588 (ISSN: 0030-4018).
- [6] Wang L, Jacques SL, Zheng L. MCML – Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol 47, 1995, pp 131–146 (ISSN: 0169-2607).
- [7] Heng RL, Lee E, Pilon L. Radiation characteristics and optical properties of filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Opt. Soc. Am. A*, vol 31, 2014, pp 836–845 (ISSN: 1084-7529).
- [8] Fanjul-Vélez F, Salas-García I, Arce-Diego JL. Analysis of laser surgery in non-melanoma skin cancer for optimal tissue removal. *Laser Physics*, vol 25, 2015, pp 025606–1, 8 (ISSN: 1054-660X).