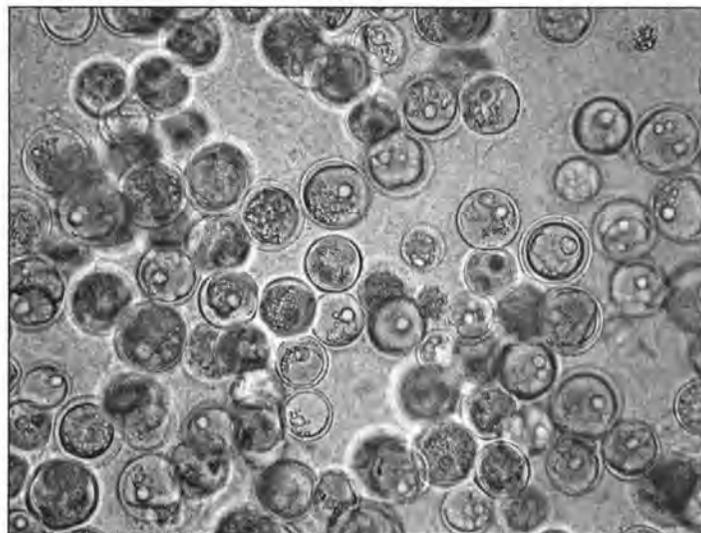


Trabajo de Suficiencia investigadora  
(Septiembre 2003)

**Determinación del contenido lipídico en**  
***Cryptocodinium cohnii***  
**por citometría de flujo**



**Adelina de la Jara Valido**

## Índice

Abreviaturas y acrónimos .....	1
1. Introducción .....	2
2. Material y métodos .....	3
2.1. Cultivo celular	
2.2. Análisis gravimétrico y cromatográfico	
2.3. Citometría de flujo	
2.4. Análisis de datos	
3. Resultados .....	6
4. Discusión .....	8
5. Conclusión .....	9
6. Bibliografía.....	10

Portada: células de *Cryptocodinium cohnii*

## **Abreviaturas y acrónimos**

AGPCLs: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

DHA: ácido docohexaenoico

RN: rojo nilo

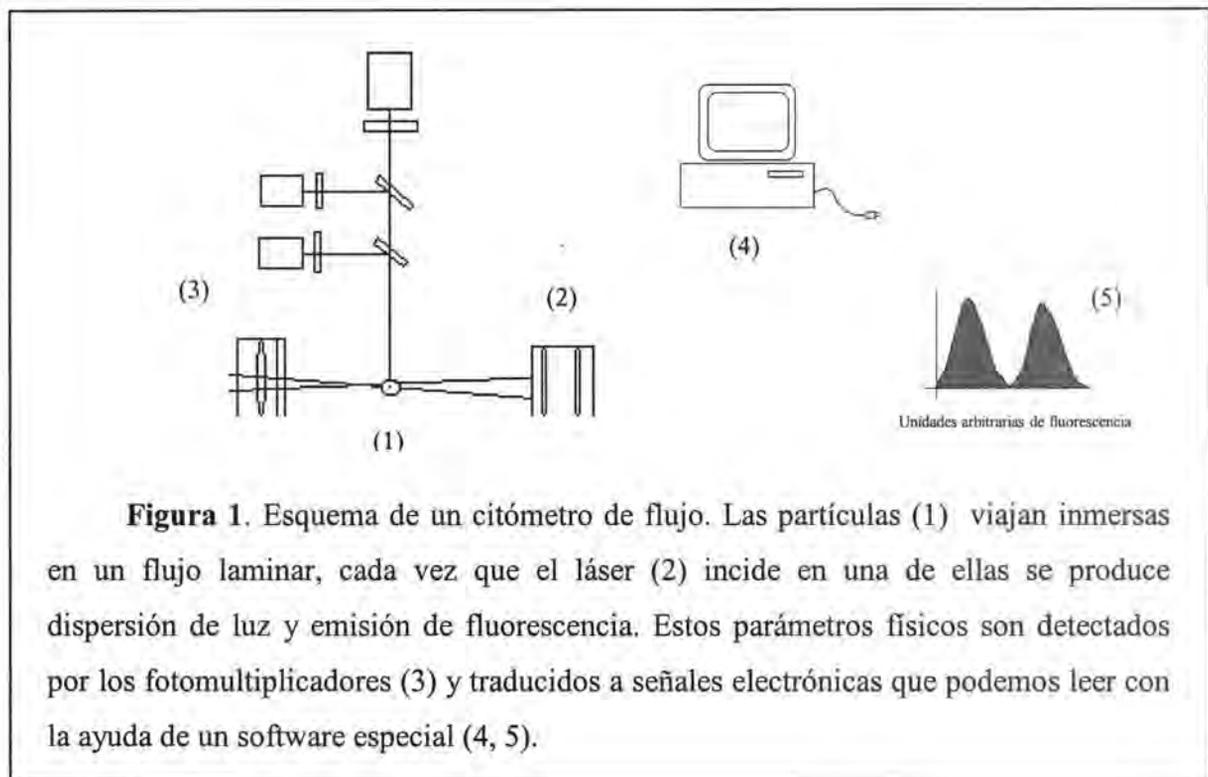
## 1. *Introducción*

Los lípidos son nutrientes vitales para el crecimiento celular ya que, además de constituir la reserva energética de la célula (Dempster y Sommerfeld, 1998), son estructuralmente indispensables. Químicamente son ésteres de ácidos grasos. Una clase especial dentro del conjunto de ácidos grasos son los poliinsaturados de cadena larga (AGPCLs) (Salhi, 1994) que encontramos fundamentalmente en los fosfolípidos de las membranas biológicas. Los precursores de este grupo se denominan ácidos grasos esenciales, su ruta de síntesis se encuentra únicamente en las células vegetales y el resto de los organismos nos vemos obligados a incorporarlos a través de la “dieta verde”. La gran importancia de estos compuestos junto a las carencias de la alimentación actual conlleva la necesidad de usar complementos dietéticos (leches, mantequillas, postres y bollería enriquecidos con  $\omega$ -3) fabricados a partir de aceites extraídos de organismos productores.

Es importante que los organismos productores constituyan, de por sí, una fuente de alto rendimiento. Si además se puede manipular el perfil a partir de las condiciones de cultivo, es posible rentabilizar el producto y abaratar su precio en el mercado. Ciertas microalgas cumplen estos requerimientos, su perfil lipídico es realmente interesante y, además, se puede modificar manipulando ciertos parámetros físico-químicos (luz, temperatura y/o disponibilidad de nutrientes) (Borowitzka, 1988; Chelf, 1990). El control de las distintas condiciones de cultivo sobre la calidad bioquímica del cultivo debe ser periódica. Las técnicas que nos permiten llevar a cabo esta tarea son muy diversas: cromatografía, gravimetría, y fluorimetría (Lee *et al.*, 1998).

De las técnicas enumeradas, la fluorimetría es la más sencilla y rápida, es necesario, solamente, un marcador fluorescente específico. Diversos estudios sobre el marcador solvatocrómico Rojo nilo (NR; 9-diethylamina-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) marca lípidos celulares, fluoresciendo exclusivamente en ambientes hidrofóbicos (Greenspan and Fowler, 1985; Greenspan *et al.* 1985). Este marcador se ha usado previamente en la cuantificación espectrofluorométrica de lípidos polares y neutros (Alonzo and Mayzaud, 1999). La citometría de flujo es una técnica fluorimétrica que permite medir simultáneamente autofluorescencia y fluorescencia de células individuales a medida que viajan en un flujo laminar (fig. 1).

El organismo seleccionado para este estudio fue *Cryptocodinium cohnii*, un dinoflagelado heterotrófico marino con un contenido lipídico mayor del 20% de su peso seco y cuyo contenido en DHA representa más del 30% de los ácidos grasos totales (Harrington and Holz, 1968, Swaaf *et al.*, 1999). El objetivo de este estudio fue comprobar la idoneidad del marcador RN combinado con la citometría de flujo para evaluar de forma rápida el contenido lipídico de cultivos de *C. cohnii*.



**Figura 1.** Esquema de un citómetro de flujo. Las partículas (1) viajan inmersas en un flujo laminar, cada vez que el láser (2) incide en una de ellas se produce dispersión de luz y emisión de fluorescencia. Estos parámetros físicos son detectados por los fotomultiplicadores (3) y traducidos a señales electrónicas que podemos leer con la ayuda de un software especial (4, 5).

## 2. *Materiales y métodos*

### 2.1. *Cultivo celular*

*Cryptocodinium cohnii* (CCMP316) se cultivaron 500 mL de medio f/2 + NPM (Guillard *et al.*, 1975) enriquecido con 5 g de glucosa L<sup>-1</sup>, usando erlenmeyers de borosilicato de 1000 mL. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 20 ± 2°C con un suministro de oxígeno mediante burbujeo de aire. El inóculo se obtuvo de un stock que se mantiene mediante subcultivo semanal.

Las condiciones ensayadas fueron:

- *Disponibilidad de nitrógeno*: se obtuvo con un f/2 + NPM completo enriquecido con 5 g de glucosa L<sup>-1</sup>
- *Supresión de nitrógeno*: se obtuvo cosechando las células en fase estacionaria mediante centrifugación (5000 g min, 5 minutos) y reinoculando en medio sin N. El medio sin N se obtuvo eliminando completamente del medio las soluciones de nitrógeno (orgánica e inorgánica).

La densidad celular se controló mediante conteo diario en un hemocitómetro y se expresa como cel· mL<sup>-1</sup>. La tasa de crecimiento se calculó según Crow and Kimura (1970) y se expresa como divisiones por día (div· d<sup>-1</sup>). Las muestras para el análisis se tomaron de cultivos en diferentes fases de crecimiento.

## 2.2. *Análisis gravimétrico y cromatográfico*

A partir de un concentrado celular congelado se llevó a cabo una extracción lipídica usando para ello una modificación del método de Folch (1957). A una alícuota del concentrado celular (50-100µl) se le añadió un volumen de metanol/cloroformo (1:2, v/v), después de reposar 5 min. se centrifugó durante 2 min (5000 g min), el sobrenadante se recogió en un tubo limpio y se añadió 1 mL de una solución de cloruro de sodio (0.9%, w/v) por cada 5 mL de extracto lipídico. Esta mezcla se agitó fuertemente y se dejó reposar durante 5 minutos, al cabo de los cuales se observó la formación de dos fases, el sobrenadante se eliminó por ser una fase acuosa rica en componentes no lipídicos. La fase oleosa se denominó extracto lipídico y fue el material utilizado para determinar el contenido lipídico total, las fracciones de lípidos polares y neutros y el perfil de ácidos grasos.

El contenido lipídico total se obtuvo deshidratando el extracto lipídico (85°C, 15 min.) mediante pesada.

Las fracciones lipídicas se obtuvieron a partir del extracto lipídico mediante un protocolo modificado de Yongmanitchai and Ward, 1992. Primeramente se eluyeron los lípidos neutros con 16 mL de cloroformo a través de cartuchos de sílica. Luego se recuperaron los lípidos polares

eluyendo con 10 mL de metanol. Las fracciones obtenidas se deshidrataron (85°C, 15 min) y se determinaron gravimétricamente. Los resultados se expresan como pg lípidos· cel<sup>-1</sup>.

La composición de ácidos grasos se obtuvo a partir de biomasa congelada (una semana de almacenamiento a -20°C). Para ello se transesterificaron alícuotas de biomasa con cloruro de metanol (Petkov *et al.*, 1994). Los ácidos grasos obtenidos se purificaron usando cromatografía en capa fina. Se utilizó ácido pentadecanoico como estándar interno. Los análisis de cromatografía de gases se realizaron en un cromatógrafo Varian cp-38 con un detector FID. La identificación de los metil ésteres de ácidos grasos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención con los de estándares auténticos (Supelco F.A.M.E. Mix C4-C24).

### 2.3. Citometría de flujo

El marcado intracelular se realizó mediante una modificación del método de Dempster y Sommerfeld (1988). Se añadieron 50 µL de una solución de trabajo de RN en acetona (1mg / 10 mL) a 1 mL de cultivo (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cel/mL) y se incubaron en oscuridad (10 min., 37°C). La señal de RN se determinó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Instrumentos Becton Dickinson) equipado con un láser de argón de 488 nm. Rojo nilo es un marcador solvatocrómico, cuya fluorescencia varía espectralmente según la polaridad del medio en el que se encuentre. Al ser excitado por una longitud de onda de 488 nm, RN disuelto en lípidos neutros emite fluorescencia amarilla-dorada intensa, mientras que disuelto en lípidos polares emite fluorescencia roja (Shapiro, 1995). El sistema óptico usado en el sistema FASCSCalibur recoge la luz amarilla y naranja (560-640 nm, que corresponde a los lípidos neutros) en el canal FL2 y la luz roja (>650 nm correspondiente a lípidos polares) en el canal FL3. Aproximadamente 3000 células fueron analizadas mediante una amplificación logarítmica de la señal fluorescente. Se utilizaron células no marcadas como control interno. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia.

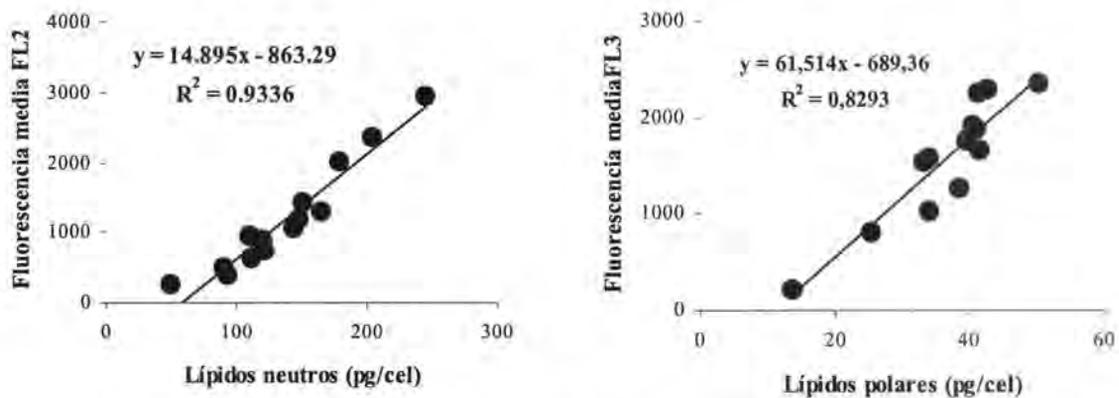
### 2.4. Análisis de datos

La significación estadística de los datos se evaluó mediante un análisis de regresión lineal determinando el coeficiente de correlación de Pearson (R). Las diferencias significativas entre las distintas condiciones de cultivo y el contenido total de lípidos, el cociente polares/neutros, el

contenido DHA y el porcentaje de DHA del total de ácidos grasos se establecieron mediante un ANOVA.  $\alpha=0.05$ ,  $n = 14$  excepto en el caso de la tasa de crecimiento en el que  $n = 44$ .

### 3. Resultados

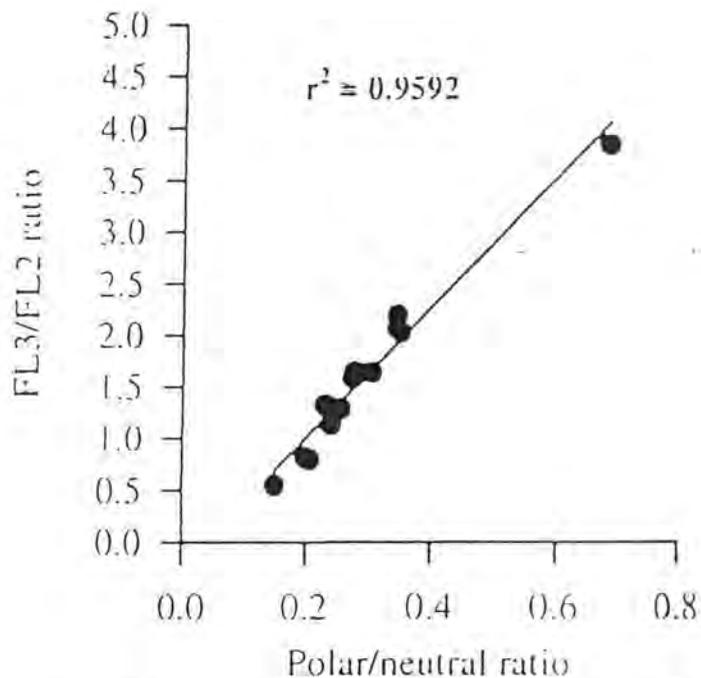
La correlación obtenida entre la señal media de fluorescencia de células marcadas con RN y el contenido lipídico determinado gravimétricamente fue alta (FL2 - neutros,  $R^2= 0.93$  y FL3 - polares,  $R^2= 0.83$ ) (fig.2). El cociente citométrico FL3/FL2, por tanto, también correlacionó con el cociente determinado gravimétricamente ( $R^2= 0.96$ ) (fig.3).



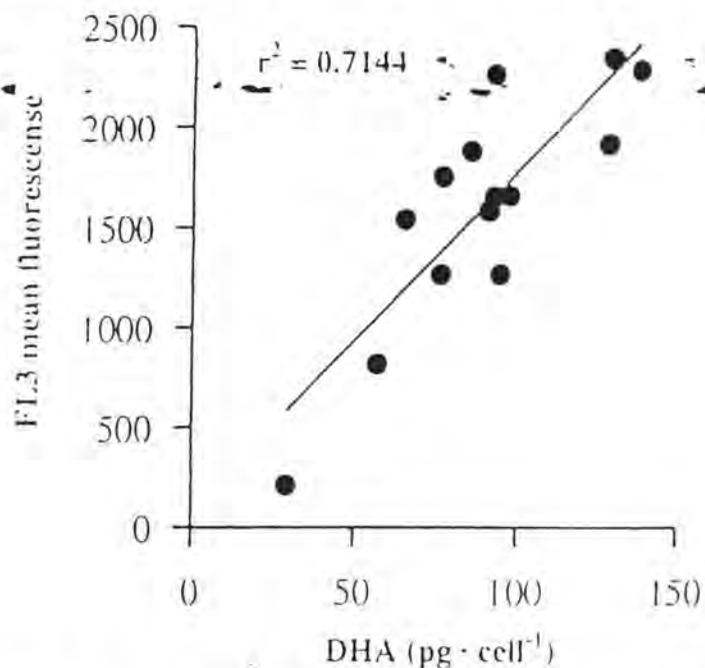
**Figura 2.** Los diagramas de dispersión representan lípidos polares y neutros Vs FL3, FL2 media respectivamente. Los datos de lípidos se expresan como pg/cel y los datos de fluorescencia como unidades arbitrarias. Las correlaciones lineales para ambos (lípidos neutros ( $R^2=0.93$ ) y polares ( $R^2=0.83$ )) son significativas.

La fluorescencia de lípidos neutros y polares correlacionó significativamente con el contenido celular de DHA determinado por cromatografía (FL2 - neutros,  $R^2= 0.60$ ; FL3 - polares,  $R^2= 0.71$ ) (fig. 4). Se encontró una correlación significativa, aunque baja, entre el cociente FL3/FL2 y el porcentaje de DHA en el contenido total de ácidos grasos ( $R^2= 0.44$ ) (fig.5). Existe una tendencia entre el cociente FL3/FL2 y la tasa de crecimiento ( $R^2= 0.56$ ) (fig.6).

En lo referente al efecto de las condiciones de cultivo en la composición lipídica, las mayores cantidades de lípidos y DHA, se obtuvieron en aquellos cultivos en los que se eliminó el nitrógeno. Sin embargo, el mayor porcentaje de ácidos grasos totales se encontraron en aquellos

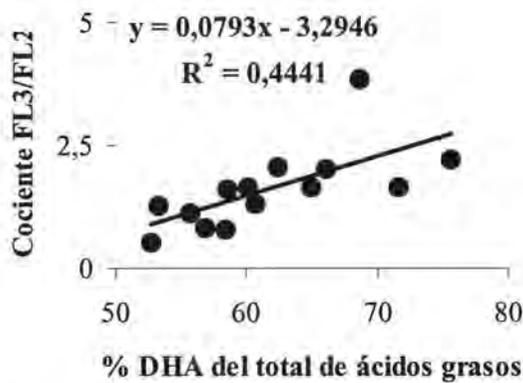


**Figura 3.** El diagrama de dispersión representa el cociente polar/neutros determinados graviméricamente frente al mismo cociente hallado citométricamente ( $R^2 = 0.9592$ )

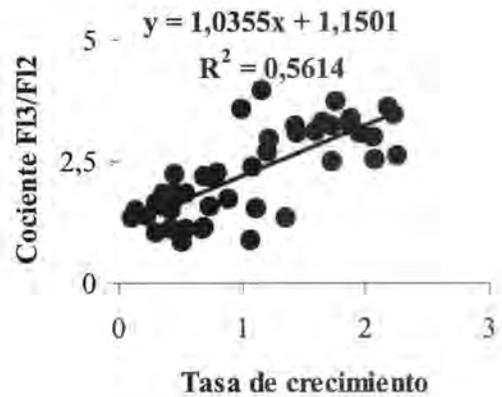


**Figura 4.** El diagrama de dispersión representa el contenido de DHA frente a la fluorescencia media en FL3 ( $R^2 = 0.7144$ )

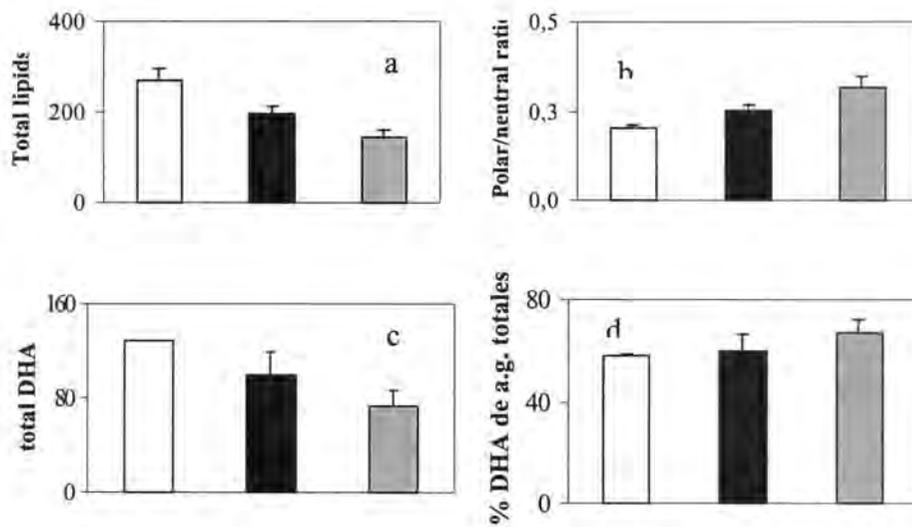
cultivos con mayor disponibilidad de nitrógeno. No se encontraron diferencias significativas entre los efectos de las diferentes condiciones de cultivo en el contenido lipídico (fig. 7).



**Figura 5.** El diagrama de dispersión representa el porcentaje celular de DHA del total de ácidos grasos Vs el cociente FL3/FL2. ( $R^2=0.44$ ).



**Figura 6.** El diagrama de dispersión representa la tasa de crecimiento ( $\text{div}\cdot\text{d}^{-1}$ ) Vs el cociente FL3/FL2. ( $R^2=0.56$ ).



**Figura 7.-** Las barras representan el efecto de las condiciones de cultivo y las fases de crecimiento (sin nitrógeno □, estacionaria ■ y exponencial ▒) en diferentes parámetros de calidad como: lípidos totales (a), cociente polares/neutros (b), pg DHA por célula (c) y % DHA del contenido total de ácidos grasos (d).

#### 4. Discusión

La buena correlación encontrada entre la fluorescencia media de la señal de células marcadas con RN y el contenido lipídico medido por gravimetría (fig.2), y por lo tanto, entre el cociente FL3/FL2 y el cociente polares/neutros determinado gravimétricamente (fig.3), coincide con los resultados espectrofotométricos obtenidos por Alonzo and Mayzaud, 1999. El hecho de que la correlación de los lípidos neutros sea mayor que la de los lípidos polares puede deberse a la longitud de onda de excitación usada en este estudio. El láser de argón usado emite a 488nm, esto difiere de los óptimos, hallados por los autores mencionados anteriormente, 530 y 560 nm para lípidos neutros y polares respectivamente. La longitud de onda de excitación de 488nm del láser de argón se aleja más del óptimo de los lípidos polares que del óptimo de los lípidos neutros. Con todo ello, los resultados prueban la utilidad de la citometría de flujo y el RN en la evaluación de la composición lipídica microalgal.

La correlación entre la fluorescencia de lípidos neutros y polares con la cantidad de DHA determinado por cromatografía (fig. 4) muestra que el DHA celular de *C. cohnii* se distribuye en ambas fracciones, polar y neutra. Sin embargo, la tendencia entre el cociente FL3/FL2 y el porcentaje de DHA en el contenido total de ácidos grasos (fig. 5) puede estar relacionada con el hecho de que la mayoría del DHA de este dinoflagelado está asociado a los lípidos polares en la fase de la curva de crecimiento de este estudio (logarítmica temprana y avanzada y estacionaria temprana) como previamente describieron Henderson *et al.*, 1988. Otros estudios (Swaaf *et al.*, 2003) descubrieron que el DHA permanecía constante en la fase estacionaria tardía, pero este estado de la curva de crecimiento no se ha tenido en cuenta en el presente estudio. En los organismos fotosintéticos más del 75% del los AGPCLs se asocian a los lípidos de las membranas fotosintéticas (Fuller and Ness, 1987), por lo tanto la determinación citométrica del cociente polares/neutros podría ser relevante con organismos fototróficos.

La tendencia detectada entre el cociente FL3/FL2 y la tasa de crecimiento (fig. 5) ha sido descrita previamente por otros autores. Estudios llevados a cabo por Roessler, 1990, mostraron que a medida que aumenta la tasa de crecimiento, aumenta el contenido lipídico polar y, por tanto, lo hace el cociente FL3/FL2. Esta situación corresponde con una alta disponibilidad de nutrientes en estadios tempranos de la curva de crecimiento, cuando la densidad celular es baja

(Borowitzka, 1988). A medida que la densidad celular aumenta, la limitación de nutrientes se vuelve crítica y se dispara la acumulación de compuestos de reserva (Chelf, 1990). Por esta razón, los mayores contenidos lipídicos y de DHA se obtuvieron en aquellos cultivos en los que el nitrógeno se eliminó. Sin embargo, los mayores porcentajes de DHA en el contenido de ácidos grasos totales se encontraron en aquellos cultivos con una mayor disponibilidad de nitrógeno, aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo, (fig. 6). Esto puede relacionarse con el hecho de que la disponibilidad de nutrientes corresponde a condiciones exponenciales de crecimiento, es decir, en el momento en el que las células se dividen activamente y sintetizan membrana (los componentes mayoritarios de la membranas son los fosfolípidos, una enorme fuente de AGPCLs (Alberts, 1989)).

La ventaja del uso de la citometría de flujo sobre otras técnicas se encuentra en la posibilidad de caracterizar y separar subpoblaciones a partir de medidas multiparamétricas (perfil lipídico, viabilidad celular,...). Diversos parámetros podrían medirse simultáneamente siempre que exista compatibilidad entre los fluorocromos usados).

## **Conclusión**

Cuantificar lípidos celulares mediante las técnicas tradicionales es una tarea larga y tediosa que implica un gran volumen de células y el uso de solventes orgánicos. La combinación de Rojo nilo y citometría de flujo para evaluar la composición bioquímica de los cultivos de *C. Cohnii* es factible y resuelve la laboriosidad de otras técnicas teniendo en cuenta que 1 mL de cultivo en fase exponencial ( $10^5$ - $10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>) basta para realizar el análisis y que, además, el rendimiento de la técnica es bastante alto (12 muestras por hora). Esto permite reducir los costes del sistema. Otra característica que se debe valorar es la posibilidad de caracterizar, identificar y separar subpoblaciones que cumplen unas característica previamente definidas. Es posible evaluar el perfil lipídico y discriminar al mismo tiempo células inviables, lo que permitiría obtener organismos de alto rendimiento capaces de establecer nuevos cultivos. Esto abre la posibilidad a nuevas líneas de investigación: monitorización de cultivos a gran escala, búsqueda de cepas productoras de lípidos, ecotoxicidad, etc. Por todo lo expuesto anteriormente, el uso de la citometría de flujo combinada con el marcador rojo de nilo supone una interesante opción a la

hora de evaluar la composición bioquímica de los cultivos de *C. cohnii*.

## 5. Bibliografía

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Ralf M., Roberts K. and Watson J.D. (1989) Molecular Biology of the Cell. Second Edition, In Omega Ed., S.A. Barcelona
- Alonzo F. and Mayzaud P. (1999) Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile Red. Marine Chemistry 67: 289-301.
- Borowitzka (1998) Micro-algal Biotechnology. In Cambridge University Press Ed.
- Chelf P. (1990) Environmental control of lipid and biomass production in two diatom species. J. Applied Phycol. 2: 121-129.
- Corzo A., Vergara J.J and García-Jiménez M.C. (1995) Isolation and flow cytometric characterisation of protoplasts from marine macroalgae. J. Phycol. 31: 1018-1012.
- Crow J.F. and Kimura M., 1970. An introduction to population genetics theory. In Harper, Row (eds.), NY.
- Dempster T. A. and Sommerfeld M.R. (1998) Effects of Environmental Conditions on Growth and Lipid Accumulation in *Nitzschia communis* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 34: 712-721.
- Folch S. and Sloanes Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. of Biological Chemistry 226: 497-504.
- Fuller G. and Nes W.D. (1987) Plant lipids and their interactions. In Fuller G. & Nes W.D. (eds), Ecology and Metabolism of Plant Lipids. ACS Symposium Series 325.
- Greenspan P. and Fowler S.D. (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. J. Lipids Res. 26: 781-789.
- Greenspan P., Mayer E.P. and Fowler S.D. (1985) Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J. of Cell Biol. 100: 965-973.
- Guillard, R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith, W.L. and Chanley M.H. (eds.) Culture of marine invertebrate Animals. Plenum Press, NY., USA.
- Harrington G. W. and Holz G.G. (1968) The monoenoic and docohexaenoic fatty acids of a heterotrophic dinoflagellate. Biochim. Biophys. Acta 164: 137-139
- Henderson R. J., Leftley J.W. and Sargent J.R., (1988) Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. Phytochemistry. 27: 1679-1683.
- Lee S.J., Yoon B. and Oh H., 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. Biotechnology Techniques. 12: 553-556.
- Petkov, G. D., Klyachko-Gurvich G.L, Furnadzhieva S.T., Pronina N.A. and Ramazanov Z.M. (1990) Genotypic differences and phenotypic changes of lipid fatty acid composition in strains of *Dunaliella salina*. Soviet Planta Physiol. 3: 268-272.
- Roessler P. G. (1990) Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. J. of Phycol. 26: 393-399.

- Salhi M., Izquierdo M.S., Hernández-Cruz C.M., Gonzalez M. and Fernández-Palacios H. (1994) Effect of lipid and *n*-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*), *Aquaculture* 124: 275-282
- Swaaf M.E., Rijk T.C., Eggink G. and Sijtsma L. (1999) Optimisation of docohexaenoic acid production in bath cultivation by *Cryptocodinium cohnii*. *J. of Biotechnology* 70: 185-192.
- Yongmanitcha W. and Ward O.P. (1992) Separation of Lipid Classes from *Phaeodactylum tricornutum* Using Silica Cartridges. *Phytochemistry* 31; 10: 3405-3408.