

Illustraciones del artículo de M. W. Beyerinck "Cultivversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen" en el que se describen algunas especies de algas verdes, entre ellas Chlorella vulgaris. Tomado de Botanical Zeitung 47: 781-785 (1890).

zu kleinen Familien vereinigt, welche in einer ebenen Fläche liegen, obschon die aufeinander den drei

48. Jahrgang.

Nr. 45.

7. November 1890.

BOTANISCHE ZEITUNG.

Redaction: II. Graf zu Solms-Laubach. J. Wortmann.

Diese Etagen als Kugel gedacht, wenn diese die

Botanische Zeitung, Jahrg. XLVIII.

Die Art, welche deckt

Diese nicht be

Die nur dann substanz

Die Zellspitzen

Extrakt

beruht auf der Ausscheidung eines tryptischen Enzyms durch die *Scenedesmus*-Zellen. Wasser, wo-

rin man etwas Eiweiss oder Gelatine zuvor mit Pancreaspulver zur Verflüssigung ge-

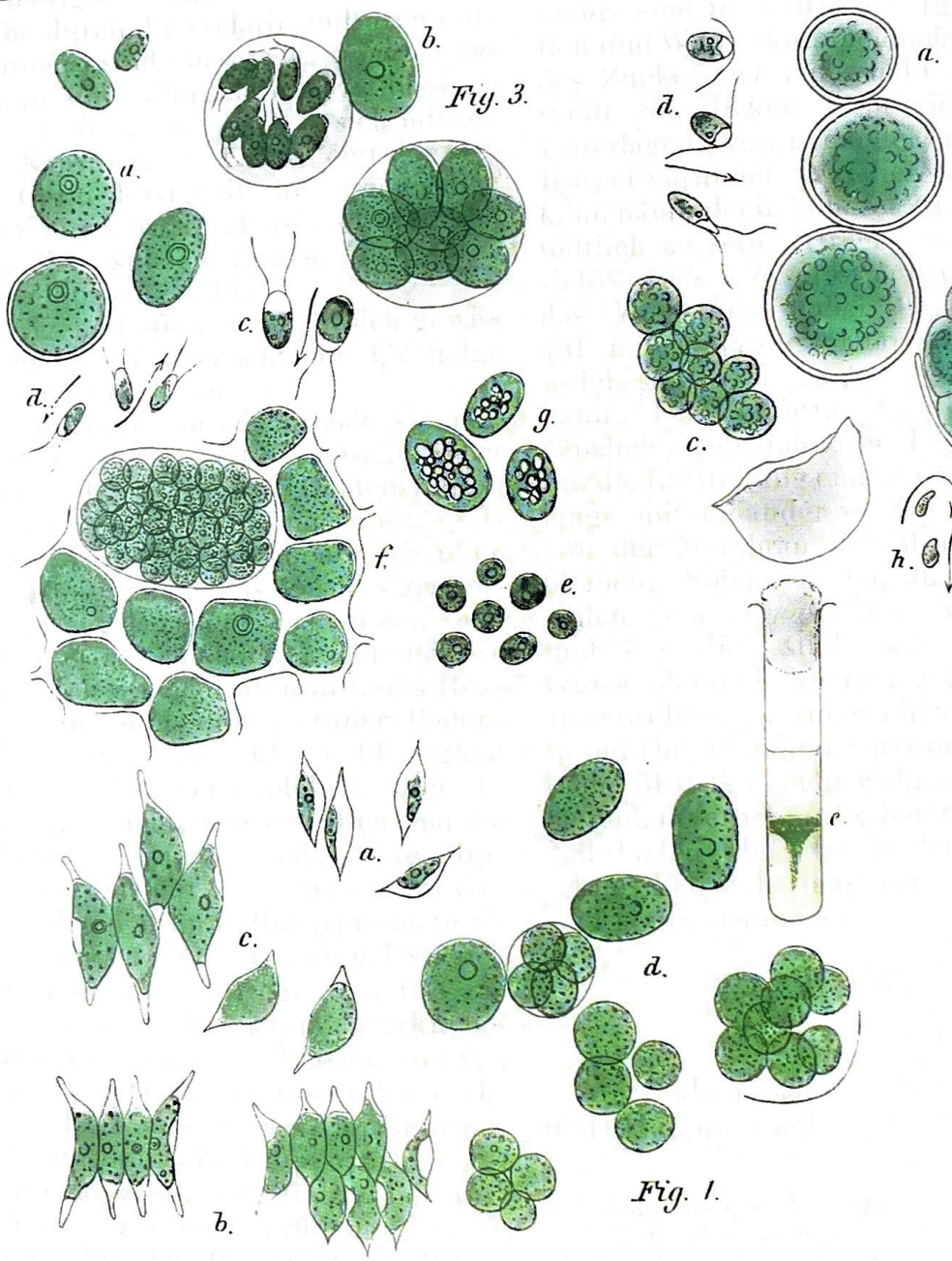
Glucose und Peptonen

schädliche Wirkung

welche

diese Art

sehr ge



Algas verdes: fábricas microscópicas de materias primas valiosas

OBTENCIÓN DE PROTOCOLOS PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO Y EXTRACCIÓN DE ADN DE *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck]

Juan Pablo Montes Jiménez^{1,2} y Mauricio Pulido Jiménez³

1. Estudiante Licenciatura en Biología, Universidad Pedagógica Nacional. 2. Investigador CEBM, Gimnasio Campestre.

3. Director CEBM, Gimnasio Campestre.

Correspondencia para el autor: centrobiomol@campestre.edu.co
jmontesjimenez@hotmail.com

Recibido: 24 de mayo de 2012

Aprobado: 24 de septiembre de 2012

RESUMEN

Las algas se han convertido en objeto de atención de los investigadores de muchas áreas del conocimiento dada su capacidad para producir diversos tipos de materias primas de considerable valor para la industria. En este trabajo se presenta la estandarización de los métodos para el aislamiento y cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck]. La técnica de siembra en plato de Petri de diluciones seriadas permitió aislar las células de *C. vulgaris* de las estructuras del hongo contaminante *Acremonium sp.*; el alga pura se cultivó en Medio Basal Bold (BBM) a una temperatura de 20 ± 2 °C, luminosidad constante de 1750 lumens y pH= 6,6. El ADN genómico del alga se obtuvo a partir de cultivos líquidos de la especie, empleando un protocolo desarrollado originalmente para tejido vegetal.

Palabras clave: microalga, *Chlorella vulgaris*, bioindicador, cultivo puro.

SUMMARY

Algae have become the subject of attention for researchers in many areas of knowledge because of its ability to produce various types of raw materials of considerable value to the industry. This paper presents the standardization of methods for the isolation and cultivation of microalga *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck]. The serial dilutions seeding on Petri dish technique allowed isolation of *C. vulgaris* cells from contaminant fungus *Acremonium sp.* structures; pure alga cells were cultured in Bold Basal Medium (BBM) at a temperature of 20 ± 2 °C, continuous brightness of 1750 lumens and pH= 6,6. Genomic DNA was obtained from liquid cultures of the specie using a protocol originally developed for plant tissue.

Key words: Microalga, *Chlorella vulgaris*, bioindicator, pure culture.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 25 años el interés por el conocimiento de la naturaleza fisiológica y metabólica de las algas ha crecido de manera considerable dadas sus características como organismos generadores de materias primas para la producción de biocombustibles de segunda generación (Palomino, Estrada, & López, 2010), biofertilizantes, proteínas para la elaboración de suplementos alimenticios para consumo humano (Morris, Quintana, Almarales, & Hernández, 1999) y concentrados para peces y otros animales (Romero, Castellanos, Torres, Claro, & López, 2009). De otro lado, muchas especies han demostrado su eficiencia en procesos de biorremediación de cuerpos de agua contaminados con metales pesados y su valor como organismos bioindicadores (Allnut & Bonner, 1987; El-Naggar & El-Sheekh, 1998; Correa, Aguirre, Palacio, & Arroyave, 2003; Safarikova, et al., 2008).

Chlorella vulgaris Beyerinck [Beijerinck] es una microalga unicelular, inmóvil, de forma esférica, con pared celular lisa y con un cloroplasto que presenta forma de copa. Su reproducción se da mediante la formación de autosporas (Des Abbayes, et al., 1989; Moronta, Mora, & Morales, 2006; Fanés, 2008) y forman grupos irregulares o colonias. Esta especie se encuentra en diferentes biotopos, incluso en simbiosis con ciliados, esponjas, hidras y otros organismos (Bourrely, 1968, citado en Correa, Aguirre, Palacio, & Arroyave, 2003).

Para llevar a cabo investigaciones con esta microalga en los campos antes referidos es necesario estandarizar los métodos de cultivo que permitan disponer

de suficiente biomasa de la misma, así como implementar técnicas y desarrollar medios de cultivo apropiados para lograr los fines deseados. Sumado a lo anterior, resulta imperativo que los trabajos dispongan tanto de una cepa pura como de métodos confiables de identificación del organismo, lo que conlleva a la incursión en otras líneas de investigación tales como los estudios filogenéticos y de identificación molecular (Wu, Hseu, & Lin, 2001).

En este trabajo se presenta la estandarización de los procedimientos para el aislamiento de *Chlorella vulgaris* en estado puro, su cultivo y la extracción de su ADN genómico. Los resultados obtenidos permitirán adelantar investigaciones relacionadas con aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos de esta especie de microalga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material algal: La microalga *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] cepa LAUN 002 fue suministrada por el laboratorio de ficología de la Universidad Nacional de Colombia. La cepa presentaba contaminación con el hongo *Acremonium sp.*, el que fue determinado mediante el uso de la tinción con azul de lactofenol y clave taxonómica para organismos fúngicos.

Aislamiento y cultivo de *Chlorella vulgaris*: Para lograr el aislamiento puro de la cepa de *C. vulgaris* se realizaron repiques mediante el uso de las técnicas de rayado en plato de Petri, siembra por punto en Medio Basal Bold (BBM) sólido y siembra en plato de Petri de diluciones 1:10 seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) preparadas en BBM líquido de un inóculo

que presentaba una alta concentración de *C. vulgaris* y *Acremonium sp.* La verificación de la eficacia de la técnica de aislamiento empleada se hizo a través de observación continua (simple vista, estereoscopio y microscopio óptico además de tinción con azul de lactofenol) con el fin de detectar crecimiento fúngico en la periferia o en la parte superior de la colonia de *C. vulgaris* e identificar conidios y otras estructuras del hongo. El alga pura se cultivó en medio BBM a una temperatura de 20 ± 2 °C, luminosidad constante de 1750 lumens y pH= 6,6. Estas condiciones de temperatura y luminosidad se lograron con las cámaras de Bioambiente Artificial Controlado (BAC) (Escobar, Hernández, & Cortés, 2008).

Extracción y purificación de ADN de *Chlorella vulgaris*: El ADN genómico de *C. vulgaris* se obtuvo a partir de cultivos líquidos del alga, empleando el protocolo reportado por Doyle y Doyle (1990) para tejido vegetal y usado por Pulido y Núñez (2010).

Evaluación de la integridad del ADN genómico: Alícuotas de los ADNs obtenidos y del marcador de masa molecular High DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA) fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1% (buffer TAE 1X, 80 voltios, 45 minutos) con el fin de verificar su integridad. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 10 minutos, se observó bajo luz ultravioleta (L.U.V.) y posteriormente fue fotografiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones del cultivo

El BBM se constituyó en un medio apropiado para el crecimiento de *C. vul-*

garis, tal como lo reportaron Álvarez (1994), Friedl y O'Kelly (2002), Cleber, Sant'Anna, Barcelos y Villela da Costa (2006, 2008), corroborando así que tanto los nutrientes como las proporciones empleadas en la preparación del medio satisfacen los requerimientos nutricionales para el crecimiento poblacional de *C. vulgaris*. Sin embargo, el medio de cultivo también permitió el crecimiento de *Acremonium sp.*, lo que dificultó el aislamiento del alga en estado puro. El desarrollo del hongo en BBM se debe a que, tal como señala Peberdy (1987), los elementos que componen los medios de cultivo usados para *Acremonium sp.* son similares a los utilizados en el medio BBM. Tales nutrientes son nitrato de sodio (NaNO_3), sulfato de magnesio (MgSO_4), fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y sulfato ferroso (FeSO_4). De otro lado, las condiciones de temperatura y luminosidad proporcionadas por las BACs para el crecimiento de *C. vulgaris* fueron considerablemente estables durante todo el estudio, hecho que garantiza la reproducibilidad de los resultados, aunque también permitieron el crecimiento de *Acremonium sp.*, puesto que Peberdy (1987) reporta el crecimiento óptimo de la mayoría de las especies de este género entre 20 y 30 °C, siendo 20 °C la temperatura más utilizada para su cultivo.

Aislamiento de *Chlorella vulgaris*

Los repiques realizados mediante la técnica de estriado y punto no fueron eficaces puesto que la contaminación con *Acremonium sp.* persistió en todos los ensayos; a lo largo del estudio no se observó disminución de la cantidad del hongo alrededor y encima de las colonias del alga. La técnica de diluciones seriadas y posterior sembrado en plato

de Petri resultó ser la más apropiada para aislar las células del alga de las estructuras fúngicas de *Acremonium sp.*

La figura 1 pone de manifiesto que en la primera y segunda réplica hubo crecimiento de ambos microorganismos en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} ; el crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC) para *Acremonium sp.* es equivalente al doble con respecto a *C. vulgaris*. En el caso de las diluciones entre 10^{-4} y 10^{-6} de la primera réplica, únicamente se observó crecimiento fúngico, pero para las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} de la segunda réplica se presentaron UFC de *C. vulgaris* aisladas del hongo.

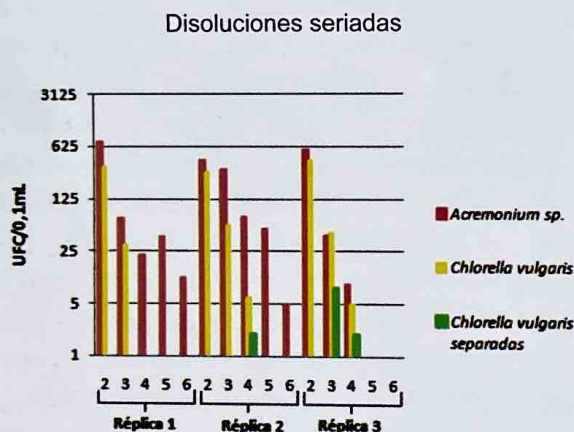


Figura 1. Unidades formadoras de colonia (UFC) de los cultivos obtenidos luego de las diluciones seriadas. Escala eje Y logaritmo en base 5

En la dilución 10^{-2} de la tercera réplica los valores de UFC fueron similares para los dos microorganismos, así como en las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} ; sin embargo, la dilución 10^{-3} mostró 8 UFC de *C. vulgaris* aisladas, mientras que en la dilución 10^{-4} se presentaron 2 UFC. En las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} no se observó crecimiento.

El aislamiento de los dos microorganismos indica que probablemente la relación entre ellos está determinada por las características del medio de cultivo

sólido. Este permite que las células tanto del hongo como del alga se mantengan agrupadas, a diferencia de lo que sucede con el cultivo líquido que admite una mayor movilidad de las células de *C. vulgaris*, lo que hace posible la separación de las estructuras fúngicas que pudieran estar adheridas a las células del alga. Al observar los cultivos en el estereoscopio y en el microscopio (usando tinción con azul de lactofenol) no se evidenció contaminación (figuras 2 y 3).

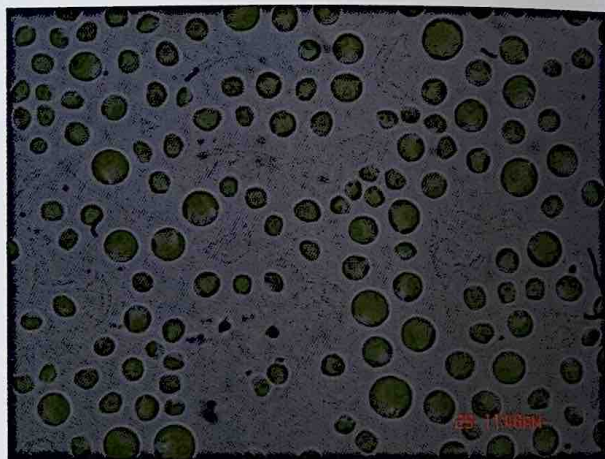


Figura 2. Cultivo de *Chlorella vulgaris* (100X).

Extracción de ADN

El protocolo reportado por Doyle y Doyle (1990) y empleado por Pulido y Núñez (2010) en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) resultó ser exitoso para la extracción y purificación de ADN genómico de *C. vulgaris*. Aunque este protocolo es principalmente utilizado para la extracción de ácidos nucleicos de tejido vegetal, resultó adecuado para células de *C. vulgaris* debido a la semejanza morfológica y fisiológica del alga con las células vegetales. Es por la misma razón que Gaponova y colaboradores (2007) recomiendan el uso de métodos de extracción de ADN diseñados y usados para plantas en organismos tales como las algas.

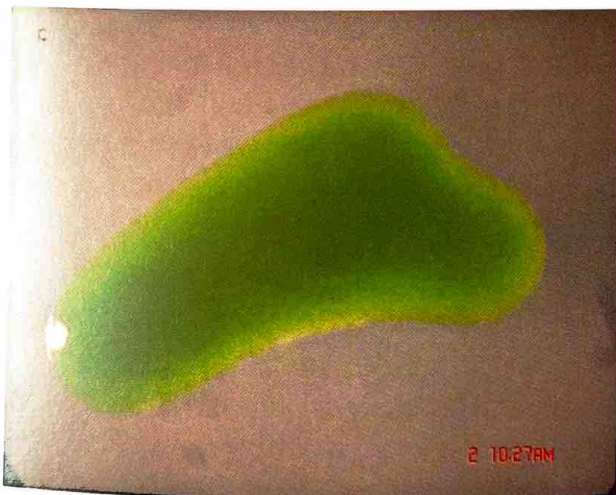
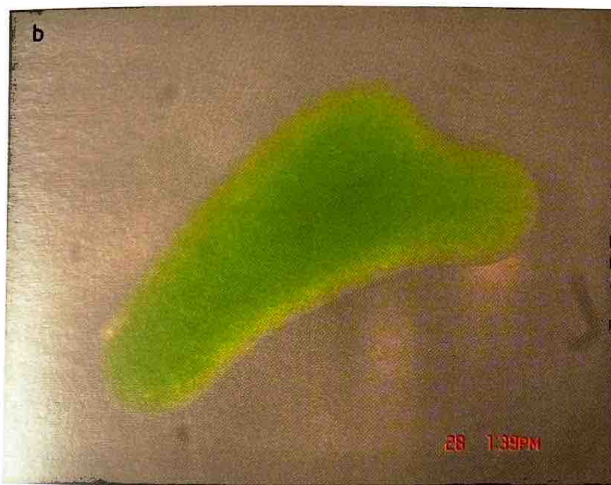


Figura 3. Colonia de *Chlorella vulgaris* aislada. a) Cultivo de un día, b) Cultivo de dos días, c) Cultivo luego de seis días sin presencia de crecimiento fúngico.

Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con lo sugerido por Fawley y Fawley (2004), quienes plantean que aunque las técnicas de

purificación de ADN para microalgas están comúnmente basadas en el uso de CTAB, se pueden presentar problemas con especies como *C. vulgaris* principalmente por la resistencia mecánica de su pared celular y su tamaño reducido. No obstante, el uso de este protocolo en la especie estudiada permitió obtener un ADN de buena calidad y abundante en términos de cantidad.

A pesar de lo anterior, vale la pena destacar que el efecto del CTAB y el β -Mercaptoetanol no fue suficiente para garantizar la lisis de las células de *C. vulgaris* y reducir la cantidad de lípidos y proteínas que pueden afectar el rendimiento y la calidad del ADN obtenido. Para subsanar este inconveniente se utilizó una mezcla de fenol y cloroformo-alcohol isoamílico (proporción 1:1), dado que en ensayos donde se utilizó solamente la mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (proporción 24:1) no se logró recuperación alguna de ácidos nucleicos. El fenol contribuye en gran medida a la desnaturación de las proteínas de pared y membrana (Puerta & Urueña, 2005), lo que conlleva a la lisis total de la célula. Evidencia de lo anterior se logró al observar la diferencia entre las interfases obtenidas en ensayos en los que se utilizó fenol y en los que no. En los primeros, el tamaño de la interfase (donde se ubican las proteínas desnaturadas tras el proceso de centrifugación) fue considerablemente mayor (figura 4). Finalmente, para obtener el precipitado de ADN fue necesario utilizar centrifugación de alta velocidad (12500 r.p.m. x 15 minutos) puesto que no se observó precipitación espontánea del mismo, probablemente debido a la poca cantidad de material algal usado al inicio del procedimiento.

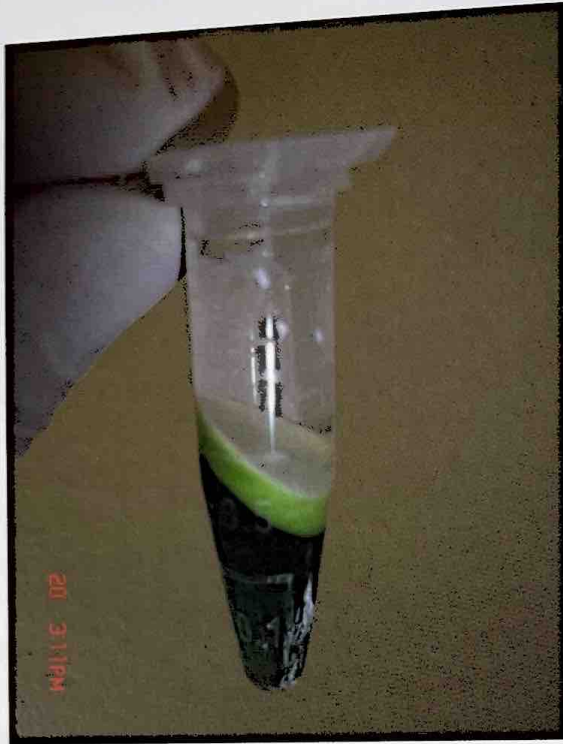


Figura 4. Diferencias en el tamaño de las interfaces en ensayos de extracción de ADN (a) usando fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (1:1) (b) usando cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Electroforesis

Las muestras analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa revelan que el protocolo de extracción utilizado permitió obtener abundante ADN sin ningún rastro de degradación o contaminación con lípidos o carbohidratos (figura 5).



Figura 5. Análisis electroforético del ADN obtenido a partir de *Chlorella vulgaris*; E1: ADN obtenido a partir de 150 mg de biomasa algal; E2: ADN obtenido a partir de 75 mg de biomasa algal.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo BBM junto con las condiciones de temperatura y luminosidad empleadas en los ensayos fueron efectivas para el cultivo *in vitro* de *C. vulgaris*, lo que permitió incrementar la cantidad de biomasa algal. Lo anterior corrobora los reportes previos hechos por Álvarez (1994), Correa y colaboradores (2003), Aguirre, Palacio, Correa y Hernández (2007). No obstante, dichas condiciones también permiten la proliferación de microorganismos contaminantes de naturaleza fúngica, lo que representa un problema tanto en el aislamiento como en el mantenimiento de cultivos de esta microalga.

El aislamiento por rayado en plato de Petri, a pesar de ser una de las técnicas más comunes para obtener cepas puras, no es eficaz en el caso de cultivos de *C. vulgaris* contaminados con *Acremonium sp.* De manera contrastante, el método

de diluciones seriadas (10^{-3} y 10^{-4}) con siembra en plato de Petri permitió obtener células de *C. vulgaris* aisladas de estructuras fúngicas de *Acremonium sp.*, lo que permitió posteriormente la toma de muestras algales sin contaminante para realizar nuevas siembras de la microalga. El protocolo basado en la lisis celular empleando CTAB junto con el uso de la mezcla fenol: cloroformo-alcohol isoamílico como método de extracción resultó exitoso. Un aspecto importante para obtener el ADN fue el uso del fenol a pH=8,0, factor determinante para garantizar la ruptura total de paredes y membranas celulares y además la retención del ADN en la fase acuosa. El método de extracción y purificación empleado con células de *C. vulgaris* permitió la obtención de ADN genómico de buena calidad y cantidad según los resultados observados en la electroforesis, por lo cual puede ser usado para la aplicación de técnicas moleculares como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

LISTA DE REFERENCIAS

- Aguirre, N., Palacio, J., Correa, I., & Hernández, E. (2007). Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones Nitrógeno:Fósforo, bajo condiciones de laboratorio. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 6(11), 11-21.
- Allnut, T., & Bonner, W. (1987). Characterization of iron uptake from ferrioxamine B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*, 85, 746-750.
- Álvarez, H. G. (1994). Introducción al método ficológico. En Escuela Superior Politécnica del Litoral (Eds.). *Folleto de algas* (pp. 21-27). Ecuador. Recuperado el 15 de julio de 2011, en http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/algas/capitulo_4.pdf
- Cleber, F., Sant'Anna, E., Villela da Costa, M., & Barcelos, J. L. (2006). Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas y Aceites*, 57(3), 270-274.
- Cleber, F., Sant'Anna, E., & Barcelos, J. L. (2008). Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. *Ciência Rural*, 38(1), 54-58.
- Correa, I. C., Aguirre, N. J., Palacio, J. A., & Arroyave, M. P. (2003). *Efecto del Cromo, Mercurio y Cadmio sobre el crecimiento poblacional de Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Des Abbayes, H., Chadefaud, M., Feldmann, J., De Ferré, Y., Gausson, H., Grassé, P. & Prévot, A. R. (1989). *Botánica: Vegetales inferiores*. Barcelona, España: Editorial Reverté S. A.
- Doyle, M., & Doyle, A. (1990). Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. *BRL Focus*, 12, 13-15.
- El-Naggar, A., & El-Sheekh, M. (1998). Abolishing cadmium toxicity in *Chlorella vulgaris* by ascorbic acid, calcium, glucose and reduced glutathione. *Environmental Pollution*, 101, 169-174.
- Escobar, F.J., Hernández, J.A., & Cortés, J.E. (2008). Diseño y construcción de bioambientes artificiales controlados para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. *El Astrolabio*, 7(2), 7-15.
- Fanés, I. (2008). *Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España*. Tesis doctoral no publicada. Universidad de Granada, Granada, España.
- Fawley, M., & Fawley, K. (2004). A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *Journal of Phycology*, 40, 223-225.
- Friedl, T., & O'Kelly, C. (2002). Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure. *European Journal of Phycology*, 37, 373-384.
- Gaponova, I., Andronov, E., Migunova, A., Vorobyev, K., Chizhevskaja, E., & Kvitoko, K. (2007). Genomic dactyloscopy of *Chlorella sp.*, symbionts of *Paramecium bursaria*. *Protistology*, 4(4), 311-317.
- Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia*, 23(1).
- Morris, H., Quintana, M., Almarales, A., & Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autótrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 13(2), 123-128.

- Peberdy, J. F. (1987). *Biotechnology handbook's Penicillium and Acremonium*. Plenum Press, New York, USA.
- Palomino, A., Estrada, C., & López, J. (2010). Microalgas: potencial para la producción de Biodiesel. En: *Memórias do IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas* (pp. 149-157). João Pessoa, Paraíba, Brasil.
- Puerta, C., & Ureña, C. (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Pulido, M., & Núñez, V. (2010). Aislamiento y secuenciación de un fragmento de DNA genómico correspondiente a la región 3' de un candidato a gen *ppo* de lulo (*Solanum quitoense* Lam.), *El Astrolabio*, 9(1), 16-27.
- Romero, T., Castellanos, J., Torres, A., Claro, M., & López, R. (2009). Balance de la producción de *Chlorella sp.* y *Moina sp.* en la UEB PISPAVÓN, Villa Clara, Cuba. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(4), Recuperado el 15 de febrero de 2011, en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040409.html>
- Safarikova, M., Rainha, B., Mosiniewicz-Szablewska, E., Weyda, F., & Safarik, I. (2008). Dye adsorption on magnetically modified *Chlorella vulgaris* cells. *Fresenius Environmental Bulletin*. 17(4), 486-492.
- Wu, H., Hseu, R., & Lin, L. (2001). Identification of *Chlorella spp.* isolates using ribosomal DNA sequences. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 115-121.