

PROTOTHECA ZOPFII (CHLOROPHYTA) CAPAZ DE UTILIZAR “GAS OIL”, REGISTRADA POR PRIMERA VEZ EN AGUAS CONTAMINADAS DE ARGENTINA

MARÍA S. VIGNA^{1,2}, JOSEFINA ALBERGHINA¹, SILVANA M. DEL MÓNACO³ & MIGUEL A. GALVAGNO³.

¹Dpto. de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria. Pab. II, 1428 Buenos Aires. Argentina. E-mail: vigna@bg.fcen.uba.ar

²Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Av. Angel Gallardo 470, 1403 Buenos Aires. Argentina.

³Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pab. de Industrias, 1428 Buenos Aires. Argentina.

ABSTRACT: Vigna, M. S., Alberghina, J., Del Mónaco, S. M. & Galvagno, M. A. 2002. *Prototheca zopfii* (Chlorophyta) able to degrade “gas oil”, recorded for the first time in contaminated waters in Argentina. *Darwiniana* 40(1-4): 45-50.

Prototheca zopfii (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) is a coccoid, colorless algae that we isolated from Reconquista River (Argentina, Prov. de Buenos Aires, Pdo. Tigre) during september 2000. Morphological and physiological (carbon sources assimilation) studies were carried out for its correct identification. The ability of *P. zopfii* for “gas oil” utilization was evaluated by its growth in culture media containing “gas oil” up to 10% (v/v) as unique carbon and energy source.

Key words: *Prototheca zopfii*, Argentina, Nutritional study, “Gas oil” utilization, Chlorophyta, Algae.

RESUMEN: Vigna, M. S., Alberghina, J., Del Mónaco, S. M. & Galvagno, M. A. 2002. *Prototheca zopfii* (Chlorophyta) capaz de utilizar “gas oil”, registrada por primera vez en aguas contaminadas de Argentina. *Darwiniana* 40(1-4): 45-50.

Prototheca zopfii es una alga cocoide, incolora que hemos aislado del río Reconquista en septiembre del 2000 (Argentina, Prov. de Buenos Aires, Pdo. Tigre). Para la correcta identificación de la especie se llevaron a cabo estudios morfológicos y fisiológicos (asimilación de fuentes carbonadas). La capacidad de utilizar “gas oil” de *P. zopfii* se evaluó por su capacidad de crecimiento en medios de cultivo conteniendo “gas oil” hasta el 10% (v/v) como única fuente de carbono y energía.

Palabras clave: *Prototheca zopfii*, Argentina, Estudio nutricional, Utilización de “gas oil”, Chlorophyta, Algas.

INTRODUCCIÓN

Prototheca zopfii Krüger 1894 (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) es un alga incolora, unicelular cocoide, su habitat más frecuente son los cuerpos de agua y suelos contaminados, incluso con petróleo y es además patógeno oportunista en hombres y animales (Sudman, 1974; Tyler et al., 1980; Janosi et al., 2000, 2001).

Cuando se describió el género por primera vez ya se señaló que era muy similar a *Chlorella* Beij. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), diferenciándose

de éste por la ausencia de pigmentación (Krüger, 1894), criterio que siguieron West (1916) y Fritsch (1956). Pero algunos autores lo ubicaron entre los hongos unicelulares por carecer de pigmentación, comenzando por Saccardo (1895) que lo clasificó como una levadura asignándolo a los Endomycetaceae (Ascomycetes), hasta Tubaki & Soneda (1959) quienes sostenían la misma propuesta. No obstante la gran mayoría de los investigadores se inclinaba por considerarlo un alga (Cooke, 1968;



Fig. 1.- Localización del río Reconquista (Buenos Aires, Argentina).

Arnold & Ahearn, 1972). Hoy en día con técnicas moleculares ya se probó la relación filogenética entre especies de este género y de *Chlorella* (Friedl, 1997; Huss et al., 1999).

La utilización de características morfológicas solamente, como caracteres diacríticos para la determinación específica de *Prototheca*, era poco satisfactoria cuando se trataba de clasificar las numerosas cepas que iban siendo aisladas de la naturaleza (Cooke, 1968; Arnold & Ahearn, 1972). Es así como Pore en 1985 establece las bases sobre las cuales hoy en día se trabaja a nivel taxonómico en este género, utilizando criterios morfológicos y fisiológicos para el reconocimiento de las especies.

En la actualidad se reconocen los siguientes taxones: *Prototheca zopffii*, especie tipo del género, *P. moriformis* Krüger, *P. stagnora* Cooke emend. Pore, *P. wickerhamii* Tubaki & Soneda y *P. ulmea* Pore (Pore, 1985, 1986).

Si bien la mención de este género es muy poco frecuente en los estudios florísticos mundiales, lo que indicaría que no es abundante en la naturaleza o bien que pasa desapercibida por ser unicelular incolora, su mención en otros estudios especialmente de tipo clínico es frecuente, lo que revela su importancia desde el punto de vista patogénico (Tindall & Fetter, 1971).

Por otra parte se ha detectado que algunas cepas de *Prototheca zopffii* poseen la capacidad de degradar distintos tipos de hidrocarburos, principalmente alifáticos, puros o mezclas de los mismos (Walker et al. 1975 a y b; Walker & Pore 1978; Suzuki et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999). Esta característica

convierte a algunas cepas de esta especie de algas en herramientas de potencial valor económico para su utilización como agentes de biorremediación en ambientes contaminados con dichos compuestos.

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo el estudio morfológico y fisiológico de la cepa aislada conducentes a su correcta determinación específica y también evaluar la propiedad que presenta de crecer en un medio de cultivo *in vitro* con "gas oil" como única fuente de carbono y energía.

MATERIAL Y MÉTODOS

Prototheca zopffii fue aislada durante septiembre del 2000 a partir de muestras de agua provenientes del río Reconquista (Argentina, Provincia de Buenos Aires, Partido de Tigre) (Fig. 1), río contaminado por acción antropogénica (Castañé et al., 1998). Los equipos utilizados para la medición de la temperatura, pH, conductividad y turbidez del agua fueron respectivamente: un termómetro de mercurio convencional, un pHmetro Hanna MI8424, un conductímetro Myron L AR 1 y un turbidímetro Hach 2100 N.

Se tomaron muestras completas con botellas estériles de 5 l de capacidad, a 1,5 m de profundidad, que se llevaron refrigeradas al laboratorio en donde se procesaron inmediatamente.

Para llevar a cabo el aislamiento a partir de la muestra de agua, se centrifugaron alícuotas de 40 ml a 5000 rpm durante 15 minutos utilizando una centrífuga de mesa Sorvall SS-4 manual, con un rotor SS-34. Los sobrenadantes fueron descartados y los precipitados se resuspendieron en un volumen final de 1 ml de agua destilada estéril para sembrarse en medio salino Yeast Nitrogen Base, Difco (YNB) agarizado con 1% (v/v) de "gas oil", como única fuente de carbono, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro.

La cepa aislada se transfirió a medio Sabouraud agarizado en pico de flauta, en tubos de 20 ml y así se conservó en el cepario de la cátedra de Ficología (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

Condiciones de cultivo:

En todos los casos las incubaciones se llevaron a cabo a 27 ± 1 °C durante los tiempos indicados en cada ensayo; con agitación a 200 rpm en un agitador rotatorio para el caso de los cultivos líquidos y estáticamente para los cultivos en medio sólido.

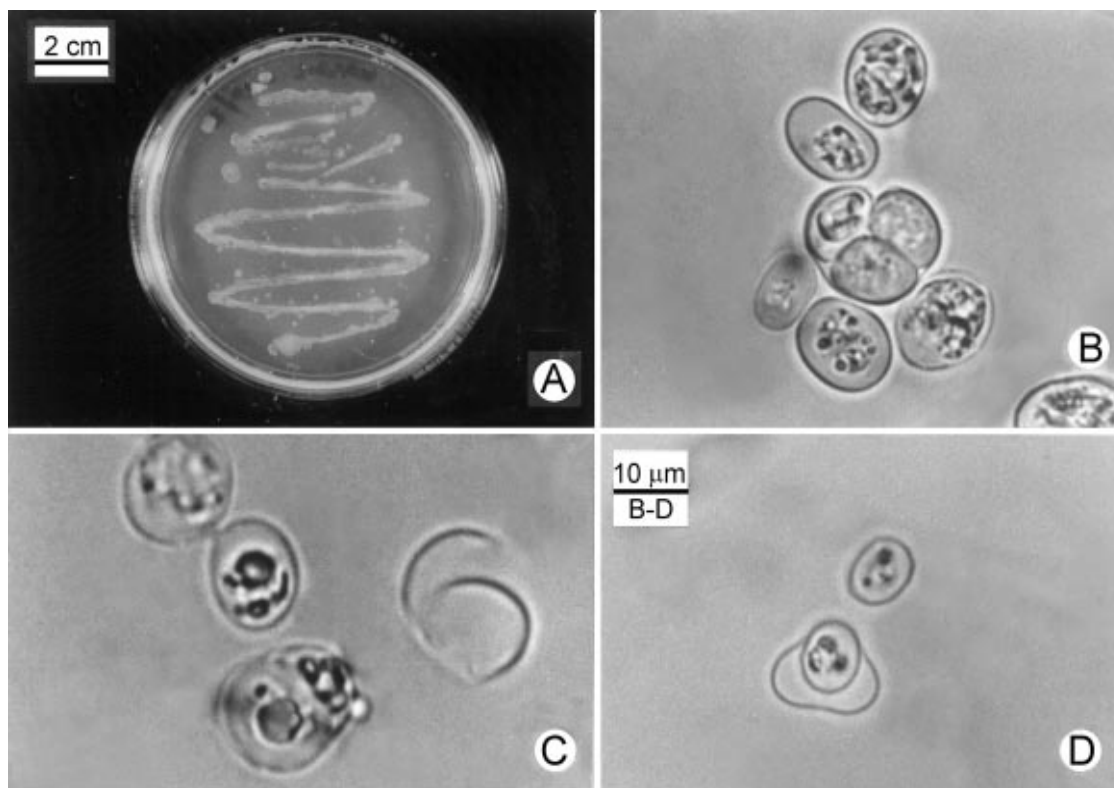


Fig. 2.- *Prototheca zopfii* Krüger. A: aspecto general de las colonias, en medio de cultivo agarizado. B-C: células vegetativas y paredes celulares vacías del autosporocisto. D: autosporas liberándose.

Asimilación de fuentes carbonadas:

Para los estudios de aprovechamiento de fuentes carbonadas se utilizó como medio basal el medio PIM (Pore, 1985) líquido y agarizado, el que fue suplementado con los siguientes compuestos carbonados de grado analítico al 1% (p/v): D-(+)-glucosa, acetato de sodio, D-(+)-galactosa, 1-propanol y D-(+)-trehalosa, incluyéndose un control no suplementado.

Se utilizó un inóculo proveniente de medio YNB líquido suplementado con 1 % de glucosa, que se hizo crecer durante 48 horas. Las células a inocular se lavaron por centrifugación y resuspensión en agua destilada estéril. Para los ensayos en medio líquido (50 ml de medio de cultivo en Erlenmeyers de 250 ml), se inocularon 10^5 células/ml y los cultivos se desarrollaron durante 48 y 72 horas.

Para los ensayos en medio agarizado se inocularon cajas de Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo 10 ml del medio de cultivo, con 0,1 ml de una suspensión celular de 10^4 células/ml, la que se distribuyó sobre la superficie del medio con una espátula de Drigalsky. Las placas de Petri se incubaron por un

período total de 21 días realizando observaciones semanales.

El crecimiento se evaluó en el caso de los medios líquidos espectrofotométricamente como densidad celular, midiendo la absorbancia a 630 nm, de una suspensión celular adecuada, utilizando un equipo Metrolab 330. Cuando se utilizaron medios sólidos, el crecimiento se evaluó visualmente como superficie del medio cubierta con colonias del alga, dándole valores arbitrarios: + (crecimiento evidente dentro de la 1^{er} semana de incubación), ± (crecimiento evidente luego de la 2^{da} semana), - (no crecimiento al cabo de 21^o día).

Utilización de “gas oil”:

Para evaluar la capacidad de la cepa de metabolizar “gas oil”, se utilizó medio PIM líquido suplementado con las siguientes concentraciones de “gas oil” comercial : 0; 1; 5 y 10 % (v/v). El medio se inoculó con 10^3 células/ml, proveniente de un cultivo desarrollado en el mismo medio conteniendo 1 % de “gas oil”, durante 48 horas. Antes de ser inoculadas las células fueron lavadas por centrifugación y

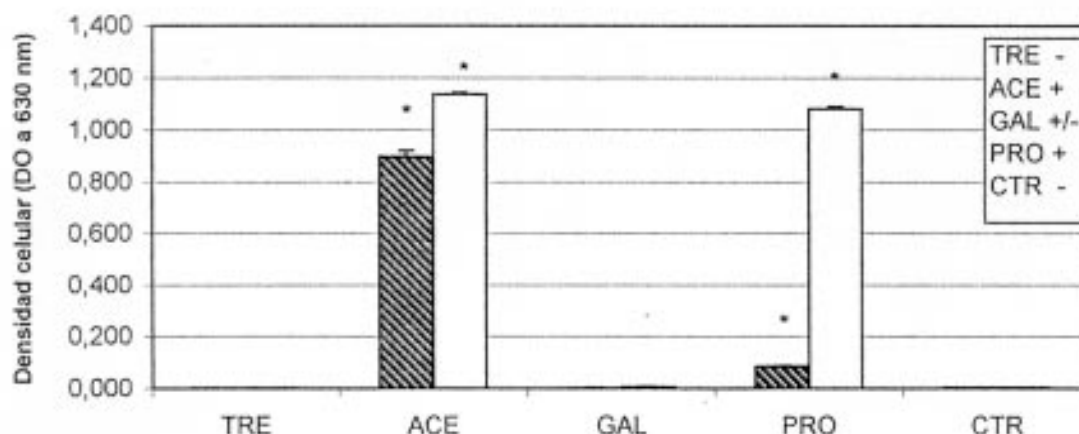


Fig. 3.- Densidad celular de *P. zopfii* en medio PIM suplementado con 1 % (p/v) de: Galactosa (GAL), Acetato de Na (ACE), 1-propanol (PRO), Trehalosa (TRE) y sin fuente carbonada al cabo de 48 horas (barra tramada) y 72 horas (barra vacía) en medio líquido y los 21 días en medio sólido (inserto). D.O.: Densidad óptica como absorbancia a 630 nm; — Desviación standard; (*) Significativamente diferente del cultivo control ($p < 0.05$).

finalmente se resuspendieron en agua destilada estéril. El crecimiento se evaluó a los 7, 14 y 21 días por recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de diluciones celulares apropiadas en medio PIM agarizado conteniendo glucosa 1% (p/v).

En los gráficos la altura de la barra representa el promedio de los valores de un test hecho por duplicado y repetido por lo menos una vez.

La evaluación de la respuesta del alga a las diferentes fuentes de carbono y a las concentraciones de "gas oil" y los ensayos control (sin fuente carbonada) se realizaron utilizando ANOVA de un factor con un nivel de $p < 0.05$ (Zar, 1996).

Estudios morfológicos:

El estudio morfológico fue realizado mediante la observación del material con microscopio óptico Zeiss Standard 14 equipado con tubo de dibujo y cámara fotográfica automática.

Se realizaron tinciones con solución de lugol para detectar la presencia de almidón y con azul de metileno para detectar la presencia de vaina.

RESULTADOS

Descripción morfológica:

Colonias blancas de bordes ondulados, brillantes, cremosas. Células hidrofóbicas cuando crecen en medio líquido (Fig. 2 A).

Células esféricas a ovoideas y algunas pocas reniformes, con un leucoplasto laminar y gránulos

de almidón. Autosporocistos esféricos u ovoideos (Fig. 2 B-D).

Reacción con lugol positiva evidenciando la presencia de almidón. Vaina ausente.

Dimensiones: células vegetativas esféricas: 10-12 μm de diám. y ovoideas: 6-8 x 8,5-12 μm ; autosporocistos esféricos: 14-15 μm de diám. y ovoideos: 8-12 x 12,5-16 μm ; autosporas esféricas: 4-5 μm de diám. y ovoideas: 4-5 x 5-7 μm .

Las características físico-químicas del agua en el momento del muestro fueron, temperatura: $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, pH: $7,2 \pm 0,1$, conductividad: 695 μS y turbidez: 66 NTU.

Ensayos de nutrición:

Para confirmar la determinación específica del aislamiento de *Prototheca* se valoró el crecimiento celular en las distintas fuentes carbonadas (Fig. 3) (diferencia significativa con respecto al control ANOVA $p < 0.05$). Se comprobó que la cepa aislada fué capaz de utilizar como fuentes carbonadas: acetato (como su sal sódica), 1-propanol, y no utilizó galactosa ni trehalosa, al cabo de 72 horas de incubación. En los cultivos desarrollados en medio agarizado, los resultados valorados al 21° día de cultivo no variaron cualitativamente respecto de los obtenidos en medio líquido en cuanto a la asimilación de acetato, 1-propanol y trehalosa; pero sí en cuanto a la asimilación de galactosa. Si bien en este último caso el crecimiento sobre este monosacárido no alcanzó los valores observados para 1-propanol

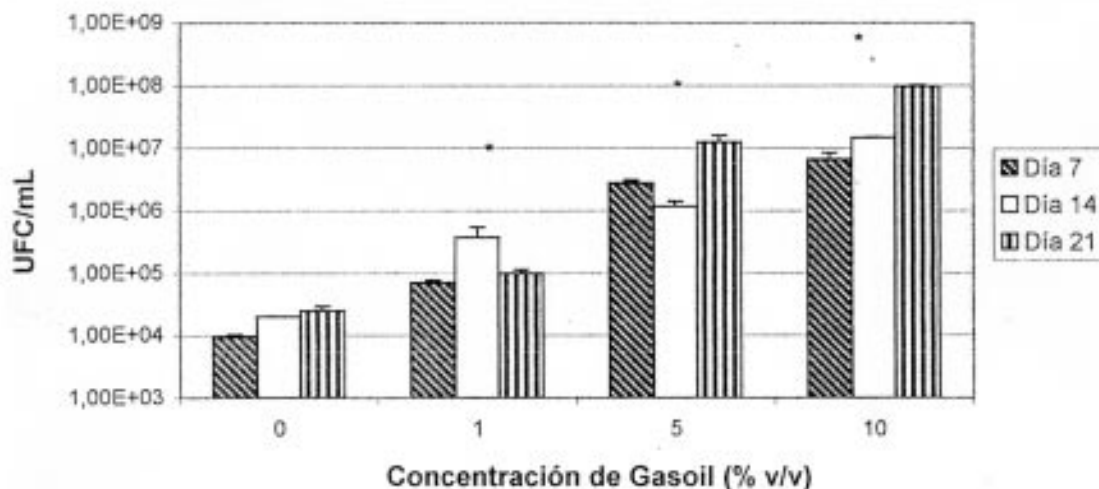


Fig. 4.- Crecimiento de *P. zopfii* en medio PIM suplementado con “gas oil” a las concentraciones (v/v) indicadas y no suplementado, al cabo de 7, 14 y 21 días de incubación. — Desviación standard; (*) Significativamente diferente del cultivo control ($p < 0.05$) en el día correspondiente.

y acetato, fué superior al hallado para trehalosa y el cultivo control sin fuente carbonada, como se muestra en el inserto de la figura 3; lo que probaría la lenta asimilación de este azúcar atribuida a *P. zopfii* (Pore, 1985).

Crecimiento en hidrocarburos

Los resultados obtenidos de crecimiento de *P. zopfii*, incubada en medio basal conteniendo distintas concentraciones de “gas oil”, por distintos períodos de tiempo (Fig. 4), evidenciaron que la cepa aislada era capaz de utilizar “gas oil” como único recurso de carbono y energía para su crecimiento, difiriendo este significativamente para todas las concentraciones ensayadas respecto del control no suplementado con fuente carbonada (ANOVA, $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Mientras que *Prototheca* es un género fácilmente distinguible, las cuatro especies que lo constituyen no lo son tanto, al menos por sus características morfológicas (Pore, 1985). Así, la incapacidad de utilizar trehalosa y la capacidad de utilizar 1-propanol y acetato como fuentes carbonadas permitieron diferenciar con seguridad a *P. zopfii* de *P. wickerhamii* presente, en forma numéricamente mayoritaria, en aguas contaminadas (Tubaki & Soneda, 1959).

La capacidad de desarrollarse en un compuesto como el “gas oil” y muy probablemente de degradarlo, hacen de esta cepa de *Prototheca zopfii*, reportada como patógeno humano (Tindall & Fetter, 1971), un riesgo potencial para el hombre en zonas contaminadas con hidrocarburos u otros xenobióticos de origen antropogénico.

Por otro lado, la posible utilización de esta alga para trabajos de biorremediación en sistemas estrictamente confinados, la convierten en una herramienta potencial para el tratamiento de materiales de distintos orígenes conteniendo hidrocarburos y derivados del petróleo, como es el caso de numerosos residuos industriales.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnold, P. & Ahearn, D. G., 1972. The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamenta*. *Mycologia* 64: 265-275.
- Castañé, P. M., Loez, C. R., Olguín, H. F., Puig, A., Rovedatti, M. G., Topalián, M. L. & Salibián, A., 1998. Caracterización y variación espacial de parámetros físico químicos y del plancton en un río urbano contaminado (Río Reconquista, Argentina). *Revista Int. Contam. Ambient.* 14: 69-77.
- Cooke, W. B., 1968. Studies in the genus *Prototheca*. II. Taxonomy. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 84: 217-220.
- Friedl, T., 1997. The evolution of the Green Algae. pp. 87-101, en D. Bhattacharya (ed.), *Origins of algae and their plastids*. Springer-Verlag Wien. New York.

- Fritsch, F. E. 1956. *The Structure and Reproduction of the Algae*. 1: 1-791. Cambridge University Press, Cambridge.
- Huss, V., Frank, C., Hirner, M., Kloubocek, A., Seidel, B., Wenzeler, P. & Kessler, E. 1999: Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* "sensu lato" (Chlorophyta). *J. Phycol.* 35: 587-598.
- Jánosi, S., Szigeti, G., Rátz, F., Laukó, T., Kerényi, J., Tenk, M., Katona, F., Huszenicza, A., Kulcsán, M., Huszenicza, G. 2000. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Vet. Quart.* 23 : 80-83.
- , Ferenc, R., Tibor, L., Gábor, S., János, K., Miklós, T., Ferenc, K., Margit, K. & Gyula, H. 2001. A szarvasmarha *Prototheca zopfii* alga okozta togygyulladás: a megbetegedés elso magyarországi megallapítása. *Magy. Állatorv. Lapja* 122: 7-14.
- Krüger, W., 1894. Beiträge zur Kenntniss der Organismen des Saftflusses (soq. Schlemflusses) der Laubbäume. Parts I and II. *Zopf's Beiträge Physiologie zat Morphologie niederen der Organismen* (Leipzig) 4: 69-116.
- Pore, R. S. 1985. *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia* 90: 129-139.
- . 1986. The association of *Prototheca* spp. with slime flux in *Ulmus americana* and other trees. *Mycopathologia* 94: 67-73.
- Saccardo, P. A. 1895. *Sylloge fungorum* 11: 1-753. Pavia.
- Sudman, M. S. 1974. Protothecosis, a critical review. *Amer. J. Clin. Pathol.* 61: 10-19.
- Suzuki, T., Yamaguchi, T. & Ishida, M. 1998. Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons. *Process. Biochem.* 33: 541-546.
- Tindall, J. P. & Fetter, B. F. 1971. Infections caused by achloric algae (Protothecosis). *Arch. Derm.* 104: 490-500.
- Tubaki, K. & Soneda, M. 1959. Cultural and taxonomical studies on *Prototheca*. *Nagaoa* 6: 25-34.
- Tyler, D. E., Lorenz, M. D., Blue, J. L., Munnell, J. F. & Chandler, F. W. 1980. Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 987-993.
- Walker, J. D., Colwell, R. R., Vaituzis, Z. & Meyer, S. A. 1975 a. A petroleum -degrading achlorophyllous alga, *Prototheca zopfii*. *Nature (London)* 254: 423-424.
- , Colwell, R. R. & Petrakis, L. 1975 b. Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Appl. Microbiol.* 30: 79-81.
- & Pore, R. S. 1978. Growth of *Prototheca* isolates on n-hexadecane and mixed-hydrocarbon mixed-hydrocarbons substrate. *Appl. Environm. Microbiol.*, 35: 694-697.
- West, G. S. 1916. *Algae*. 1: 1-475. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Yamaguchi, T., Ishida, M. & Suzuki, T. 1999. Biodegradation of hydrocarbons by *Prototheca zopfii* in rotating biological contactors. *Process. Biochem.* 35: 403-409
- Zar, H. J. 1996. *Biostatistical Analysis*, 3ra Ed. Prentice Hall. 662 pp. Upper Saddle River, New Jersey.

Original recibido el 19 de diciembre de 2001; aceptado el 21 de octubre de 2002.