

Rev. Cienc. Technol.

Año 7 / N° 7a / 2005 / 80-86

MÉTODO PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN DE *MICROCYSTIS* SPP.

¹Llano, Víctor M. / ¹Meichtry, Norma R. / ²Tonon, Sergio A.

¹Laboratorio de Plancton y Bentos. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Rivadavia 2370. Posadas, Misiones, (3300) Argentina. (vmlano@yahoo.com)

²Laboratorio de Biología Molecular Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Félix de Azara 1552. Posadas, Misiones, (3300) Argentina. (labimap@mbf.unam.edu.ar)

ABSTRACT

METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF DNA FROM *MICROCYSTIS* SPP.

Alga blooms disrupt the normal aquatic equilibrium, generating low quality waters with unpleasant smells and flavors. Furthermore, some species are capable of generating toxins dangerous to animals and humans. The study of bloom's genetic diversity is of the utmost importance in order to identify the different cyanobacterium genera involved, mainly focusing in toxic individuals. Our objective is to develop an effective and fast method for the isolation and purification of genomic DNA from *Microcystis* spp., a model of toxic cyanobacteria. The proposed method is sufficient for obtaining good quantity and quality genomic DNA suitable for molecular genotyping.

KEY WORDS: Cyanobacteria, DNA isolation, *Microcystis* spp., blooms.

RESUMEN

Las floraciones de cianobacterias (blooms) alteran el equilibrio acuático, afectan otros organismos, y degradan la calidad del agua por la producción de olor y sabor desagradable. A estos, se le puede sumar el efecto aun más grave de que ciertos géneros son capaces de producir toxinas que afectan a animales y humanos. Debido a la alta dinámica de las floraciones en ecosistemas eutrofizados, es importante el estudio de su diversidad genética a fin de identificar las distintas poblaciones participantes. El objetivo del presente trabajo ha sido la elaboración de un protocolo de trabajo eficaz y rápido que sea óptimo para la extracción y purificación de ADN de *Microcystis* spp. como uno de los géneros más representativos de las cianobacterias tóxicas. La cantidad y pureza del ADN obtenido por el mismo se encuentra en los rangos aceptables para la mayoría de las técnicas moleculares de genotipificación.

PALABRAS CLAVES: Cianobacteria, aislamiento de ADN, *Microcystis* spp., floración.

INTRODUCCION

Las cianobacterias o cianofíceas (algas verdes-azules), son organismos procariotas que pueden encontrarse en forma unicelular estricta, en agregados celulares o en filamentos, cuyos pigmentos no están organizados en cromatóforos [1, 2]. Estos organismos dependen del proceso fotosintético para la obtención de energía, y se estima se habrían originado hace unos 3500 millones de años.

Su facilidad de crecimiento favorece su desarrollo tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en ambientes dulceacuícolas, de aguas alcalinas o neutras, con pH superior a 7,5, temperaturas por encima de 25°C y una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo.

La creciente eutrofización de los ambientes acuáticos puede favorecer su proliferación masiva o floración (Harmful Algae Blooms -HABs- o simplemente "Blooms"). Estos blooms pueden ser detectados a simple vista o en otros casos no percibirse, encontrándose dispersos en todo el volumen de agua o localizarse a cierta profundidad formando estratos de muy poco espesor [3].

El ecosistema acuático se ve alterado por los blooms de cianobacterias, principalmente por efecto del sombreado. Este inhibe la capacidad fotosintética de otras algas

y afecta a los animales del entorno disminuyendo la disponibilidad de oxígeno disuelto para la respiración, y degradando la calidad del agua por producción de olores y sabores desagradables. Pero el efecto más grave, es la potencialidad de ciertos géneros para la producción de toxinas, que son capaces de provocar síntomas agudos y crónicos luego del contacto o la ingestión por animales y el hombre [4, 5, 6].

La toxicidad de los blooms de cianobacterias está asociada, entre otros factores, al tamaño de la floración y a su complejidad, dado que algunas especies pueden presentar en una misma floración cepas tóxicas con diferentes rangos de toxicidad y cepas inocuas. La especie colonial *Microcystis aeruginosa* Kütz. (Figura 1 a, b), es una de las más peligrosas debido a su capacidad de biosintetizar una potente toxina, la microcistina. La concentración de esta toxina puede variar o inhibirse en respuesta a cambios ambientales, por lo cual es recomendable suponer que el bloom de *Microcystis* es siempre potencialmente tóxico [7].

Debido a la alta dinámica de las floraciones de cianobacterias en ecosistemas eutrofizados (géneros involucrados, capacidad toxicogénica, cantidad relativa, etc.) es importante estudiar su diversidad genética a fin de identificar las distintas poblaciones participantes. En este contexto, las técnicas moleculares son herramientas de

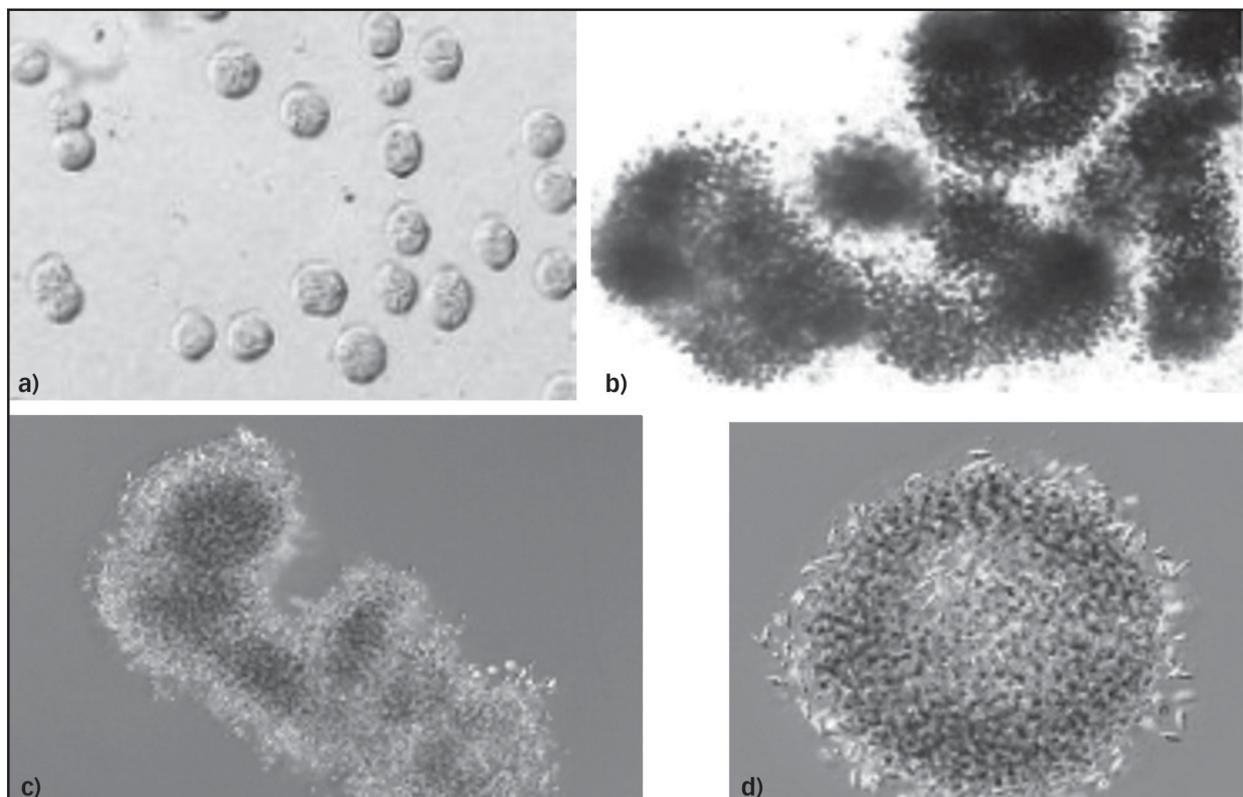


FIGURA 1: *Microcystis aeruginosa*, a) Detalle de las células 1000x, b) Colonia de *Microcystis aeruginosa* 400x, c) y d) Colonias con mucilago evidente 400x.

gran ayuda para la clasificación taxonómica de las especies presentes, debido a que este grupo de algas posee una gran plasticidad fenotípica [8, 9]. Dentro de la variedad de técnicas moleculares actualmente disponibles para la genotipificación de organismos, el requerimiento de ADN de una cierta calidad y pureza es un requisito indispensable. Para ello, es necesario el desarrollo de metodologías de extracción y purificación de ADN genómico que contemplen las particularidades de los organismos bajo análisis.

En el caso de las cianobacterias, el mucílago y la pared celular (figura 1 c, d) que las rodean son un importante impedimento para el aislamiento de ADN de buena calidad. Algunos grupos han logrado buenos resultados, en cuanto a la ruptura de paredes de algas verdes azules, mediante la utilización de detergentes tales como DTAB o CTAB [10, 11]. Se han informado protocolos más simples, pero estos solo son aplicables a unas pocas especies [12, 13]. Es por ello que sigue siendo necesario el desarrollo de metodologías rápidas y confiables para la extracción y purificación de genoma de cianobacterias.

El objetivo del presente trabajo ha sido la elaboración de un protocolo eficaz y rápido para la extracción y purificación de ADN genómico de *Microcystis* spp. como uno de los géneros más representativos de las cianobacterias tóxicas.

Se espera que este protocolo pueda extenderse a otras especies, eventualmente aplicando pequeñas modificaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material fitoplanctónico fue extraído a nivel subsuperficial, filtrando 100 litros de agua a través de una red de plancton de 20 μm de abertura de malla, (Figura 2) y depositado en frascos de 250 ml de capacidad (Figura 3). Las muestras se obtuvieron en diferentes estaciones de colecta sobre el cauce principal del río Paraná, aguas arriba y aguas debajo de la presa Yacyretá (27° 28' S 56° 44'

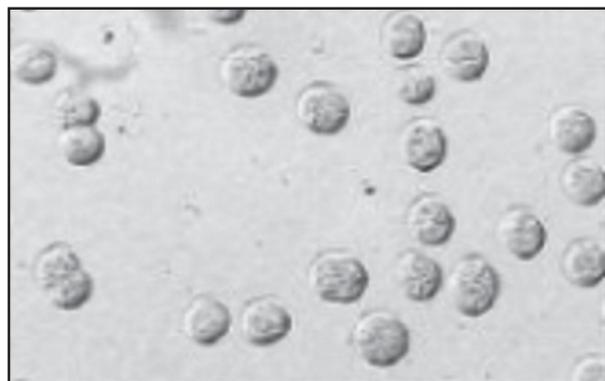


FIGURA 2: Filtrado de agua a través de una red de plancton.

O) y un tributario (arroyo Itaembé), en el primer semestre del 2004.

Una de las características del género *Microcystis* es la de poseer vesículas de gas y formar en la muestra acuosa una capa superficial. Aprovechando esta cualidad, con la ayuda de una pipeta Pasteur se absorbió dicha capa y se filtró el mayor volumen posible empleando un matraz quitasato de 250 ml y trampa de agua. El filtro utilizado fue de 20 μm de abertura de malla. El filtrado se desecó en estufa durante 40 minutos a 37 °C hasta eliminación total de la humedad (Figura 4). Una alternativa que se probó fue almacenar el material filtrado a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

El material empleado en los procesos de aislamiento y purificación de ADN genómico (muestra analítica) correspondió al raspado de la materia orgánica desecada sobre los filtros, en una cantidad equivalente a un cuarto del volumen de un tubo eppendorf de 1,5 ml.

A partir de las muestras analíticas, se desarrollaron tres etapas generales para el protocolo de extracción y purificación de ADN genómico:

a) Lisis celular

En esta etapa se probaron tanto procedimientos mecánicos como químicos, utilizándose: mortero, perlas de



Figura 3: Muestra filtrada en frasco de 250 ml.

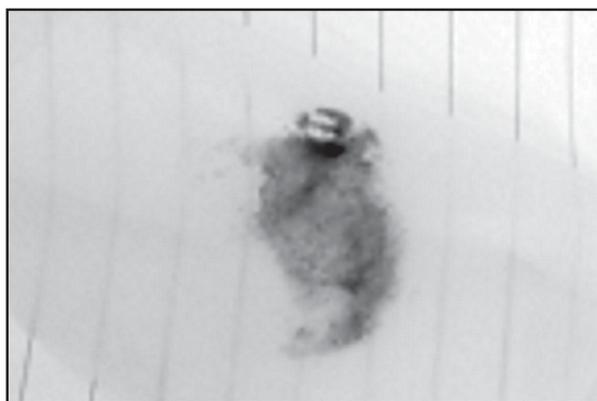


Figura 4: Filtrado en malla de 20 μm de abertura.

plomo, N₂ líquido, CTAB 2X (bromuro de cetrimetil amonio), lisozima, proteinasa K.

b) Purificación de ADN

Se realizaron lavados con cloroformo: alcohol isoamílico, fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, por separado o bien en forma conjunta.

c) Precipitación del ADN

Se probaron tanto isopropanol puro como NaCl en isopropanol.

La cuantificación y pureza del ADN obtenido fue analizada por espectrofotometría empleando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-1601PC, de acuerdo a Berger [14].

Materiales

Se emplearon los siguientes reactivos y drogas para el análisis

- ♦N₂ líquido
- ♦Solución de extracción CTAB (Bromuro de cetrimetil amonio).
 - 2% CTAB
 - 1,4 M NaCl
 - 20mM EDTA
 - Tris-HCl (pH 8)
 - 1% PVP (polivinilpirrolidona, 40000 D.)
 - H₂O destilada
- ♦Stock de fosfato de potasio monobásico. Se disolvió 136 mg de fosfato de potasio monobásico en 10 ml de agua destilada.
- ♦Stock de lisozima (USBiological) 5mg/ml, (para 30 reacciones). Se guardó a -20 °C. 5 mg de lisozima se disolvieron en 1 ml de stock de fosfato de potasio monobásico.
- ♦Se tomó 30 µl de este stock y se agregó 270 µl de agua destilada.
- ♦1 M Tris-HCl (pH 8). Se disolvieron 3,63 g de Tris en 15 ml de agua destilada, se verificó que el pH bajara has-

ta 8 con ácido clorhídrico fumante, luego se agregó agua destilada hasta llegar a 30 ml.

♦Stock NaCl 5 M. Se disolvieron 1,46 g de NaCl en agua destilada y se llevaron a 5 ml.

♦TESM.

50 mM Tris-HCl (pH 8)

100 mM NaCl

5 mM EDTA (pH 7)

A 20 ml de agua destilada se agregó 2 ml de de 1 M Tris-HCl (pH 8) y 0,8 ml de solución stock de NaCl 5 M; luego se agregó agua destilada hasta llegar a 40 ml.

♦Stock SDS 10% en TESM.

1g de SDS en 10 ml de TESM

♦Solución de SDS/proteinasa K, (para 6 muestras).

720 µl de stock SDS 10% en TESM

480 µl TESM

360 µg proteinasa K

♦24:1 cloroformo: alcohol isoamílico.

♦25:24:1 fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.

♦Isopropanol.

♦5 M NaCl en isopropanol.

♦Se disolvieron 5,84 g de NaCl en 20 ml de isopropanol.

♦70% etanol.

Como primera aproximación metodológica se implementó para la lisis celular un macerado de las muestras analíticas en N₂ líquido, empleando en primera instancia mortero a temperatura ambiente, luego perlas de plomo incorporadas al macerado y finalmente solución de extracción CTAB. La purificación constó únicamente de dos lavados en volúmenes iguales con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), recuperándose la capa acuosa por centrifugación y precipitándose los ácidos nucleicos con isopropanol puro a -20°C y posterior lavado con etanol 70% a temperatura ambiente. Los resultados de esta primera estrategia se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Valores de absorbancia, cantidad e índice de pureza obtenidos empleando la primer estrategia metodológica.

Muestra analítica	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	[ADN]total (ng/µl)	Índice de Pureza
Río Paraná, Itá-Ibaté.05/03/04	0,057	0,052	57	1,1
Arroyo Itaembé.04/03/04	0,213	0,267	213	0,8
Río Paraná, frente a desemb. del arroyo Yabebiry. 04/03/04	0,150	0,184	150	0,8
Río Paraná, embalse (E10MI). 25/02/04	0,139	0,171	139	0,8

A los efectos de incrementar la pureza del ADN obtenido, en una segunda etapa del trabajo, se modificó el proceso de lisis celular incorporando posteriormente a la maceración con N_2 líquido en mortero, una digestión enzimática con lisozima y proteinasa K. Además, para la purificación de los ácidos nucleicos se probaron dos alternativas:

a) dos lavados con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y dos lavados con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 (muestra 1, 2, 3 y 4).

b) cuatro lavados consecutivos con volúmenes iguales de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (muestra 5 y 6). Finalmente, la precipitación se realizó con NaCl en isopropanol a -20°C y un lavado final con etanol 70%. Los resultados de esta segunda estrategia se presentan en la Tabla 2.

Finalmente, se probó en la etapa de purificación el empleo de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 como única solución de lavado en dos oportunidades, manteniendo el resto de los parámetros sin modificación con respecto a la segunda estrategia. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demostraron la factibilidad de extraer ADN en cantidades suficientes pero sin alcanzar la pureza requerida para la mayoría de las técnicas moleculares de genotipificación ($>1,3$ y $<1,9$) [14].

Estas modificaciones técnicas permitieron recuperar mayores cantidades de ácidos nucleicos, sin embargo, la pureza de los preparados no mostró cambios, siendo aún inferior a lo deseable.

Tabla 2: Valores de absorbancia, cantidad e índice de pureza obtenidos empleando la segunda estrategia metodológica.

Muestra analítica	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	[ADN] total (ng/ μ l)	Masa total (μ g)	Índice de Pureza
1 Río Paraná, Rincón Santa María. 08/03/04	0,221	0,301	553	22	0,7
2 Río Paraná, Toma de agua Ituzaingó. 10/03/04	0,094	0,110	235	9	0,9
3 Río Paraná, Rincón Santa María. 08/03/04	0,169	0,179	424	17	0,9
4 Río Paraná, embalse (E10MI). 16/03/04	0,290	0,267	725	29	1,1
5 Río Paraná, Toma de agua Ituzaingó. 10/03/04	0,284	0,290	710	28	1
6 Río Paraná, Toma de agua Ayolas. 17/03/04	0,173	0,172	433	17	1

Tabla 3: Valores de absorbancia, cantidad e índice de pureza obtenidos empleando la tercera estrategia metodológica.

Muestra analítica	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	[ADN] total (ng/ μ l)	Masa total (μ g)	Índice de Pureza
Río Paraná, Toma de agua Ituzaingó. 05/05/04	0,372	0,296	930	28	1,3
Río Paraná, Rincón Santa María. 05/05/04	0,365	0,284	914	37	1,3
Río Paraná, embalse (E4C). 16/03/04	0,532	0,393	1330	40	1,4
Río Paraná, embalse (E4MD). 16/03/04	0,639	0,458	1597	48	1,4
Río Paraná, embalse (E9MD). 16/03/04	0,565	0,447	1412	57	1,3
Río Paraná, embalse (E10MD). 16/03/04	0,468	0,318	1168	35	1,5

El cambio introducido en esta tercera estrategia permitió alcanzar niveles de pureza compatibles con la mayoría de las técnicas moleculares en uso rutinario.

De esta manera se estableció como protocolo final el siguiente procedimiento:

Lisis de células

Se filtró el máximo volumen posible del concentrado de algas con malla de 20 µm, dependiendo del volumen que se obtuvo de la filtración de 100 litros.

El filtrado se secó en estufa a 37°C durante 30 minutos, hasta eliminación total de la humedad.

Se rescató el filtrado y se maceró con N₂ líquido en mortero a temperatura ambiente.

El mortero se lavó con 700 µl de TESM y se colocó todo el volumen en un tubo de 2 ml.

Se agregó 300 µl de una dilución 1/5 de stock de lisozima y se incubó a 37°C durante 60 minutos.

Se agregaron 200 µl de solución SDS/proteinasas K (50 µg/ml) y se incubó a 55°C durante toda la noche.

Luego se inactivó la proteinasa K por ebullición durante 10 minutos.

Purificación del ADN

Se enfrió la muestra a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Se agregó 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se invirtió el tubo varias veces hasta que se formó una emulsión. Este paso se realizó con cuidado para evitar dañar el ADN.

Se centrifugó la muestra por 5 minutos a 13000 x g.

La capa acuosa se transfirió a un tubo nuevo teniendo cuidado de no absorber la interfase.

Si el sobrenadante quedara sucio, se debe proceder a realizar tantos pasos de extracción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico sean necesarios. En nuestro protocolo, dos lavados fueron suficientes. Tener en cuenta que cada 2 lavados se pierde aproximadamente un 20 % de muestra.

Precipitación del ADN

Se agregó a la capa acuosa NaCl en isopropanol frío. Se invirtió el tubo varias veces y se llevó a -20 °C, durante al menos 30 minutos.

Se centrifugó por 10 minutos a 13000 x g. Con cuidado se eliminó el sobrenadante invirtiendo el tubo.

Se agregaron 1000 µl de etanol al 70 %.

Luego se centrifugó por 10 minutos a 13000 x g y se eliminó por inversión el etanol teniendo cuidado de no perder el precipitado. Se secó el precipitado dejando el tubo destapado durante unos minutos.

El precipitado de ADN se resuspendió en 50 µl de agua destilada.

La muestra se conservó a -20 °C.

CONCLUSIÓN

El empleo de esta metodología de extracción y purificación de ADN de *Microcystis* permite la obtención de material en cantidad suficiente y con la pureza adecuada para realizar metodologías de genotipificación molecular. El mismo ha sido empleado para la puesta a punto de RAPDs (resultado no mostrado), obteniéndose patrones de bandedo interpretables, coincidiendo con la pureza genómica requerida.

El empleo de esta metodología permitirá desarrollar técnicas para el análisis rápido y confiable de géneros involucrados en "blooms" y, por lo tanto, la detección de aquellos potencialmente asociados a la biosíntesis de toxinas peligrosas, con la consecuente alerta temprana disparadora de acciones tendientes a minimizar la problemática ecológica y de salud en áreas de alto impacto natural. ●

REFERENCIAS

1. **Geitler, L.** *Cyanophyceae in Rabenhorst's Kryptogamen-Flora*, Akad. Verlagsges., Leipzig. 14: p. 1-1196. 1932.
2. **Bourrelly, P.** *Les algues d'eau douce III*, Editor. Boubée & C^{ie}, Paris. p. 1-512. 1981.
3. **Pizzolon, L.; Tracanna, H.; Silva, H.; Prospero, C.; de Fabricius, A.; García de Emiliani, M.; Otaegui, A.; Amalfi, M.; Labollita, H.; Santinelli, N.; Sastre, V.** *Inventario de ambientes dulceacuícolas de la Argentina con riesgo de envenenamiento por cianobacterias*, Ingeniería Sanitaria y Ambiental 33: 26-34. 1997.
4. **Paerl, H.** *Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria) in Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*, Editor. Cambridge University Press, Cambridge. p. 261-315. 1991.
5. **Carmichael, W.** *Liver failure and human deaths at a haemodialysis centre in Brazil: microcystins as a major contributing factor*, Harmful Algae News 15-21. 1996.
6. **Vasconcelos, V.** *Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects*, Limnetica 20: 45-58. 2001.

7. García de Emiliani, M.; Devercelli, M.

Fitoplancton y floración de cianobacterias en el Lago Parque General Belgrano en Protección y restauración del Lago del Parque del Sur, Municipalidad de Santa Fe y CERIDE, Santa Fe. Cap. IV, p. 1-14. 2002.

8. Otsuka, S.; Suda, L.; Matsumoto, S.; Watanabe, M.
Morphological variability of colonies of Microcystis morphospecies in culture, J. Gen. Appl. Microbiol. 46: 39-50. 2000.

9. Bittencourt-Oliveira, M.; Oliveira, M.; Yunes, J.
O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética, Biotecnologia Ciencia E Desenvolvimento. 23: 44-47. 2001.

10. Fiore, M.; Moon, D.; Tsai, S.; Lee, H.; Trevors, J.
Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria, J. Micro. Meth. 39: 159-169. 2000.

11. Fawley, M.; Fawley, K.

A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae, J. Phycol. 40: 223-225. 2004.

12. La Claire II, J.; Herrin, D.

Co-isolation of high-quality DNA and RNA from coenocytic green algae, Plant. Molec. Biol. Rep. 15: 263-272. 1997.

13. Wu, X.; Zarka, A.; Boussiba, S.

A simplified Protocol for Preparing DNA from Filamentous Cyanobacteria, Plant Molec. Biol. Rep. 18: 385-392. 2000.

14. Berger, S.; Kimmel, A.

Guide to molecular cloning techniques, Methods in Enzymology. Vol. 152, Academic Press, New York. p. 49-55. 1987.

Recibido: 10 de Diciembre de 2004.

Aprobado: 18 de Mayo de 2005.