



## ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL

### CRYOPRESERVATION OF *CHLORELLA* SP. ISOLATED FROM MUNICIPAL WASTEWATER

### CRIOPRESERVACIÓN DE *CHLORELLA* SP. AISLADA DE AGUAS RESIDUALES MUNICIPALES

José Avila<sup>1,2</sup> & José Luis Llanos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Santiago de Surco, Lima, Perú.

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Marina y Continental. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Santiago de Surco, Lima, Perú.  
Correo electrónico: jose\_avila22@hotmail.com

The Biologist (Lima), 2014, 12(2), jul-dec: 275-281.

## ABSTRACT

Cryopreservation is a suitable method for maintaining microalgal cultures for long periods of time, conserving their genetic characteristics, as well as reducing the cost of maintenance and storage space. The aim of this study was to evaluate a two-step cryopreservation protocol using dry ice and the cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) at 3% (v/v) in a *Chlorella* sp. strain isolated from municipal wastewater. Post-thawing cellular concentration after five days was similar from reported values in non-cryopreserved cultures ( $p=0.49$ ), despite the low viability (1.63%) obtained. Also, there were no morphologic alterations compared with non-frozen cells. This investigation is the first report of a cryopreservation protocol for a *Chlorella* sp. strain from wastewater.

**Keywords:** *Chlorella*, cryopreservation, dry ice, viability.

## RESUMEN

La criopreservación es un método adecuado para mantener cultivos de microalgas por un largo período, conservando sus características genéticas a la vez que permite reducir el costo de mantenimiento y espacio de almacenamiento. El objetivo del presente estudio fue evaluar un protocolo de criopreservación usando hielo seco para su congelamiento y el crioprotector dimetil sulfóxido (DMSO) al 3% (v/v), en una cepa de *Chlorella* sp. aislada de aguas residuales municipales. La concentración celular post-congelación luego de 5 días no fue diferente a los valores reportados en cultivos no congelados ( $p=0,491$ ), a pesar de que se obtuvo 1,63% de viabilidad. Asimismo, no se evidenció alteraciones morfológicas con respecto a células no congeladas. El presente estudio constituye el primer reporte de un protocolo de criopreservación para *Chlorella* sp. aislada de aguas residuales.

**Palabras clave:** *Chlorella*, criopreservación, hielo seco, viabilidad.

## INTRODUCCIÓN

Desde inicios de los años 60, la criopreservación se comenzó a explorar como una alternativa en el mantenimiento de microalgas. Las ventajas que esta ofrece son: 1) bajo costo en el mantenimiento de las cepas; 2) preservación de la diversidad genética; y 3) reducido espacio de almacenamiento (volúmenes de 1ml a 2 ml) (Day & Brand 2005). Asimismo, esta es ideal para conservar cepas a largo plazo en comparación a técnicas como el secado y liofilizado (Day & Deville 1995, Day et al. 2000, Taylor & Fletcher 1999, Day 2007, Esteves-Ferreira *et al.* 2013).

El protocolo de criopreservación más utilizado es el de dos pasos, el cual consta en llevar la muestra a una temperatura de entre  $-30^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  (paso uno) a una tasa de congelación controlada (usualmente de  $-1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) para luego colocarla en nitrógeno líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ) durante un periodo de tiempo determinado (paso dos). Este protocolo minimiza la formación intracelular de cristales de hielo y el daño por choque osmótico (Day & Harding 2008).

*Chlorella* es una microalga clorofita que ha sido estudiada ampliamente en los campos de biomedicina, nutrición humana (Yan-Juan *et al.* 2013), ingeniería genética (Liu *et al.* 2014), entre otras (Safi *et al.* 2014). La criopreservación de esta microalga fue una de las primeras en reportarse en la literatura científica (Holm & Halsen 1963). A pesar de que existen diferentes protocolos para la criopreservación de microalgas dulceacuícolas, la respuesta a este método depende de, entre otros factores, la fisiología del organismo (Salas-Leiva & Dupré 2011), la cual suele diferir entre cepas de *Chlorella* (Kessler & Huss 1992). Una de las variables que afectan significativamente este aspecto es el ambiente de donde son aisladas las microalgas (Hwang & Horneland 1965, Xu &

Hu 2013). A la fecha, los cultivos utilizados en criopreservación provienen de ambientes naturales o de bancos comerciales (Day & Harding 2008). En el campo de la biorremediación, aquellas aisladas de aguas residuales representan una opción ideal para la remoción de fosfatos y nitratos en comparación a cepas estándares (Zhou *et al.* 2012). Es así que su mantenimiento es vital para el desarrollo de futuras investigaciones biotecnológicas en dicho campo (Cai *et al.* 2013).

Ningún estudio a la fecha ha reportado un protocolo de criopreservación para cepas provenientes de aguas residuales. Asimismo, en Perú, no existen trabajos publicados sobre la aplicación de este método en el mantenimiento de cultivos microalgales. En este sentido, la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de criopreservación para *Chlorella* sp. aislada de aguas residuales municipales usando  $\text{CO}_2$  sólido durante la etapa de congelación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se utilizó una cepa no axénica de *Chlorella* sp. aislada de los afluentes sometidos a pre-tratamiento de la Planta de Recuperación de Aguas del Río Surco "Ing. Alejandro Vincés Araoz" ubicado en el distrito de Surco, Lima, Perú ( $12^{\circ}6'43.52''\text{S}$  y  $76^{\circ}59'38.17''\text{O}$ , 72 msnm). Dicha cepa se obtuvo mediante el método de diluciones y raspado en agar utilizando como medio de cultivo Medio Basal Bold (MBB). La determinación taxonómica se realizó a nivel de género debido a lo complejo de la identificación a nivel especie utilizando microscopía de luz convencional (Bock 2011). Previo al experimento, las microalgas se mantuvieron en matraces Erlenmeyer con un volumen de 250 mL a iluminación constante con tres lámparas fluorescentes blancos-fríos

de 30W cada uno, agitación manual tres veces al día y temperatura de 24°C.

Una vez alcanzada la fase estacionaria temprana (día 6), se tomó 20 mL de la cepa y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL para dar un total de 10 réplicas. Estos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se agregó como agente crioprotector (CPA) DMSO al 3% (v/v) hasta el tope del tubo. Las muestras se incubaron durante 5 min (tiempo de equilibrio) a temperatura ambiente y baja intensidad de luz para asegurar la correcta penetración del CPA. A continuación, se introdujeron en una cámara de congelación, la cual contenía CO<sub>2</sub> sólido (hielo seco, T=-78,6°C), durante una h a oscuridad, luego de lo cual se almacenaron en un balón de N<sub>2</sub>L durante 3 días. Para la descongelación, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min antes de colocarse en baño maría a 40°C durante 10 min para completar el proceso.

Para evaluar la viabilidad post-congelación de cada repetición, se inoculó 0,1 mL en 9,9 mL de medio de cultivo libre del CPA (dilución 1:100) y se determinó la concentración celular luego de 5 días con un hemocitómetro (Neubauer improved, Marienfeld, Alemania) de 0,1 mm de profundidad en las condiciones antes descritas. Estos valores se compararon con cultivos controles (cepas no congeladas) mediante una prueba *T* de student para muestras independientes con un nivel de confiabilidad del 95% en el software SPSS v.21.

Asimismo, se calculó el índice de viabilidad (IV) según la fórmula propuesta por Cañavate & Lubian (1995):

$$IV = \left[ \left( \frac{C_0}{C_i} \right) \times \left( \frac{C_5}{aC_0^b} \right) \right] \times 100$$

Donde  $C_0$  es la densidad celular inicial (día 0);  $C_5$  es la densidad final (día 5); y  $C_i$  es la

densidad máxima inicial antes de la criopreservación. Para el cálculo de los coeficientes de regresión  $a$  y  $b$ , se inocularon 7 cultivos con 0,12 (d1), 0,62 (d2), 0,97 (d3), 1,73 (d4), 1,93 (d5), 2,23 (d6) y 3,33 (d7) cel·mL<sup>-1</sup>. Luego de cinco días, se determinó la concentración celular de cada cultivo y se analizó el crecimiento según las densidades iniciales y finales basada en una función potencial con la ecuación  $y = ax^b$  en Microsoft Excel.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El protocolo de criopreservación evaluado en el presente estudio mantuvo viable las muestras descongeladas de *Chlorella* sp. en todas las réplicas. La concentración del cultivo previa a la congelación fue de  $14,41 \pm 4,25 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup> y la inicial de los cultivos para los ensayos de viabilidad fue de  $0,19 \pm 0,06 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>. La concentración final fue estadísticamente similar a los valores reportados para cultivos controles ( $p=0,49$ ) en el mismo período por lo que se considera una viabilidad del 100%. Con respecto al cálculo del IV, la relación entre las densidades iniciales y finales de cultivos controles tuvo un  $R^2=0,87$  y valores de  $a=5,37$  y  $b=0,15$  (Fig. 1), lo que dio resultados bajos de viabilidad (Tabla 1). La morfología de las células post-congelación fue normal (esférica a subsférica), con algunas agregaciones de entre 3 a 4 individuos (Fig. 2).

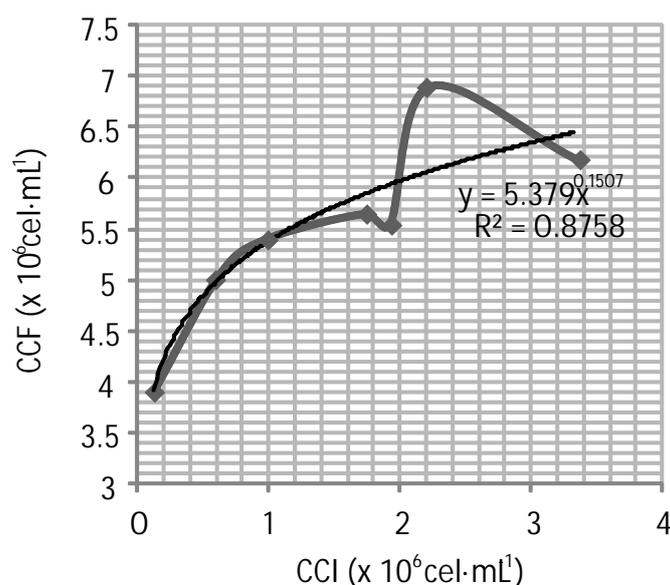
Estudios sobre criopreservación de microalgas han establecido diferentes métodos por los cuales evaluar la viabilidad post-congelación de las mismas (Taylor & Fletcher 1999). La presente investigación ha utilizado aquellas basadas en la concentración celular y crecimiento en medio de cultivo líquido, por lo que los resultados solo pueden ser comparables con estudios que hayan aplicado la misma metodología. La razón fundamental de dicha elección es que este no representa una

condición adversa de crecimiento para las microalgas luego de la criopreservación en comparación con medios sólidos (Bui *et al.* 2013). Los niveles de viabilidad reportados en diversos estudios son variables y dependen del protocolo de criopreservación utilizado. Holm-Hansen (1963) reportó niveles bajos de viabilidad (hasta un 30%) congelando directamente y sin CPA cepas de *Chlorella* sp. a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, Hwang & Horneland (1965) reportaron un 100% de viabilidad para diferentes cepas de *Chlorella* sp. utilizando una tasa de congelación controlada hasta  $-30^{\circ}\text{C}$  previo a colocarse en  $\text{N}_2\text{L}$ . No obstante, Tsuru (1973) logró 85% de viabilidad aplicando un protocolo similar al reportado por Holm-Hansen (1963). Considerando otros métodos de viabilidad utilizados, el uso de protocolos de un solo paso sin control de la tasa de congelamiento ha probado ser, en algunos casos, efectivos, mientras que aquellos que utilizan protocolos de dos pasos son los que han logrado, en su mayoría, valores altos de viabilidad y son los más utilizados actualmente (Taylor & Fletcher 1999, Day & Harding 2008). El presente trabajo utilizó un protocolo

que constó de dos pasos sin control de la tasa de congelamiento usando hielo seco en la primera etapa. El hielo seco representa una alternativa sencilla y económica para congelar las muestras, en este caso de *Chlorella* sp., previo a ser almacenadas en  $\text{N}_2\text{L}$ .

Otro factor importante a considerar es el agente crioprotector (CPA) utilizado. El DMSO es un CPA penetrante que evita la proliferación de organismos acompañantes en cultivos no axénicos (Amaral *et al.* 2013) y no resulta tóxico cuando es utilizado hasta en una concentración de 6% (Bui *et al.* 2013, Rastoll *et al.* 2013). Asimismo, un tiempo de equilibrio de entre 5 a 90 minutos resulta ideal para asegurar la penetración del CPA sin que este resulte citotóxico (Taylor & Fletcher 1999). El porcentaje de DMSO y el tiempo de equilibrio utilizado en este estudio probó ser adecuado para la criopreservación de *Chlorella* sp.

Pocos son los trabajos que han utilizado el índice de viabilidad propuesto por Cañavate & Lubian (1995b), en su totalidad enfocados a microalgas marinas. Las cepas evaluadas bajo



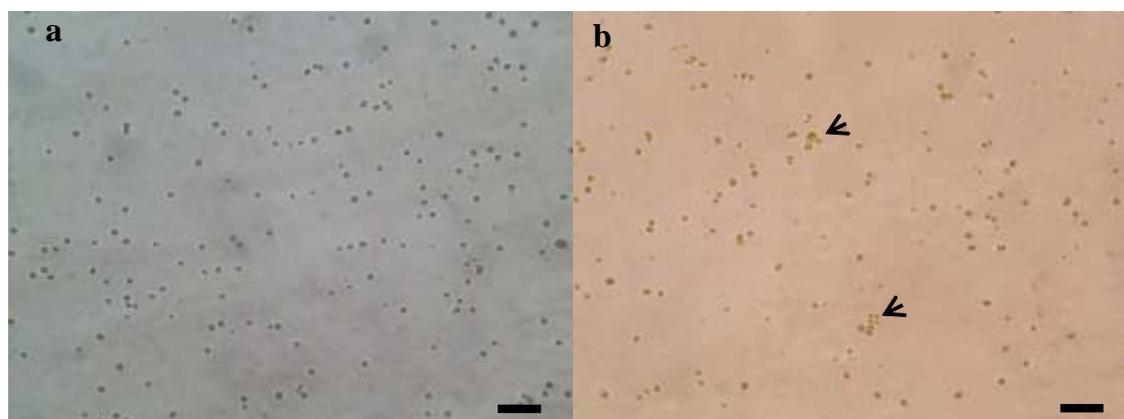
**Figura 1.** Relación entre la concentración celular inicial (CCI) y final (CCF) de 7 cultivos controles para el cálculo de la IV.

este método han exhibido porcentajes de viabilidad muy variados, desde 0,10% hasta 100% (Cañavate & Lubian 1995ab, Cañavate & Lubian 1997ab, Salas-Leiva & Dupré 2011). A pesar de obtener un IV muy bajo en comparación a la mayoría de microalgas marinas criopreservadas, las células que se mantuvieron viables fueron capaces de crecer y alcanzar valores similares de concentración celular en comparación a cultivos controles. Este es el primer estudio que evalúa la viabilidad de una cepa dulceacuícola según lo propuesto por los autores previamente mencionados.

En conclusión, el protocolo propuesto en el presente estudio representa el primer reporte de un protocolo de criopreservación para *Chlorella* sp. aislada de aguas residuales municipales. Futuros estudios deben enfocarse en evaluar la eficacia de este método en otras cepas de microalgas eucariotas y cianobacterias, tomando en cuenta los diferentes métodos para determinar la viabilidad post-congelación.

**Tabla 1.** Viabilidad post-congelación de 10 muestras de *Chlorella* sp. +: Crecimiento apreciable; IV (%): Índice de Viabilidad en porcentaje propuesto por Cañavate & Lubian (1995b); DE: Desviación estándar; NA: No Aplica. \*No hay diferencia significativa con la concentración final control en el día 5 ( $4,38 \pm 0,70 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $p=0,49$ ).

Réplicas	Crecimiento luego de 5 días	Concentración final ( $\times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	IV (%)
1	+	3,60	1,22
2	+	4,55	1,40
3	+	5,90	0,71
4	+	4,00	1,48
5	+	6,70	2,91
6	+	7,05	2,21
7	+	5,15	1,73
8	+	6,55	2,61
9	+	3,75	1,07
10	+	2,95	0,98
Promedio $\pm$ DE	NA	$5,02 \pm 1,46^*$	$1,63 \pm 0,72$



**Figura 2.** *Chlorella* sp. no congelada (a) y post-congelación (b). Se aprecian algunas agregaciones (flecha) de 3 a 4 células en las células descongeladas. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

## AGRADECIMIENTOS

A Jean Sebastián Salas Leiva por los comentarios realizados al presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, R.; Pereira, J.C.; Pais, A.C.C. & Santos, L.M.A. 2013. Is axenicity crucial to cryopreserve microalgae? *Cryobiology*, 67: 312-320.
- Bock, C.; Krienitz, L. & Pröschold, T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11(2): 293-312.
- Bui, T.V.L.; Ross, I.L.; Jakob, G. & Hankamer, B. 2013. Impact of Procedural Steps and Cryopreservation Agents in the Cryopreservation of Chlorophyte Microalgae. *PLoS ONE* 8: e78668.
- Cai, T.; Park, S.Y. & Li, Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19: 360-369.
- Cañavate, J. & Lubian, L.M. 1995a. Some aspects of the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. *Aquaculture*, 136: 277-290.
- Cañavate, J. & Lubian, L. 1995b. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Marine Biology*, 125: 325-334.
- Cañavate, J. & Lubian, L. 1997a. Effects of culture age on cryopreservation of marine microalgae. *European Journal of Phycology*, 32: 87-90.
- Cañavate J. & Lubian, L. 1997b. Effects of slow and rapid warming on the cryopreservation of marine microalgae. *Cryobiology*, 35: 143-149.
- Day, J.G. 2007. *Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria*. En: Day, J.G. & Stacey, G.N. (ed.). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press. New Jersey. pp. 141-151.
- Day, J.G. & Brand, J.J. 2005. *Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures*. En: Andersen, R.A. (ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier. Amsterdam. pp. 165-187
- Day, J.G. & DeVille, M.M. 1995. *Cryopreservation of algae*. En: Day, J.G. & McLellan, M.R. (Eds.). *Cryopreservation and Freeze-drying Protocols: Methods in Molecular Biology*. Vol. 38. Humana Press. Totowa, NJ, USA. pp. 81-89.
- Day, J.G.; Fleck, R.A. & Benson, E.E. 2000. Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. *Journal of Applied Phycology*, 12: 369-377.
- Day, J.G. & Harding, K. 2008. *Cryopreservation of Algae*. En: Reed, B.M. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer. Berlin. pp. 95-116.
- Esteves-Ferreira, A.A.; Corrêa, D.M.; Carneiro, A.P.S; Rosa, R.M.; Loterio, R & Araújo, W.L. 2013. Comparative evaluation of different preservation methods for cyanobacterial strains. *Journal of Applied Phycology*, 15: 919-929.
- Holm-Hansen, O. 1963. Viability of blue-green and green algae after freezing. *Physiologia Plantarum*, 16: 530-540.
- Hwang, S.W. & Horneland, W. 1965. Survival of algal cultures after freezing by controlled and uncontrolled cooling. *Cryobiology*, 1: 305-311.
- Kessler, E. & Huss, V.A.R. 1992. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture

- collection of the University of Texas at Austin. *Journal of Applied Phycology*, 28: 550-553.
- Liu, J.; Sun, Z.; Gerken, H.; Huang, J.; Jiang, Y.; & Chen, F. 2014. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. *Applied microbiology and biotechnology*, 98: 5069-5079.
- Rastoll, M.J.; Ouahid, Y.; Martín-Gordillo, F.; Ramos, V.; Vasconcelos, V. & del Campo, F.F. 2013. The development of a cryopreservation method suitable for a large cyanobacteria collection. *Journal of Applied Phycology*, 25: 1483-1493.
- Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P. Y. & Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35: 265-278.
- Salas-Leiva, J.S. & Dupré, E. 2011. Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen): analysis of the effect of DMSO temperature and light regime during different equilibrium periods. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39: 271-279.
- Taylor, R & Fletcher, R.L. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae: a review of methodologies. *Journal of Applied Phycology*, 10: 43-50.
- Tsuru, S. 1973. Preservation of marine and freshwater algae by means of freezing and freeze-drying. *Cryobiology*, 10: 445-452.
- Xu, J. & Hu, H. 2013. Screening high oleaginous *Chlorella* strains from different climate zones. *Bioresource Technology*, 144: 637-643.
- Yan-Juan, H.; Xiao-Fen, W. & Xiang-Fan, C. 2013. Analysis of the nutritional value and pharmacological action of *Chlorella*. *Progress in Modern Biomedicine*, 13(32): 6396-6398.
- Zhou, W.; Li, Y.; Min, M.; Hu, B.; Zhang, H.; Ma, X.; Li, L.; Cheng, Y.; Chen, P. & Ruan, R. 2012. Growing wastewater-born microalga *Auxenochlorella protothecoides* UMN280 on concentrated municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production. *Applied Energy*, 98: 443-440.

Received September 14, 2014.  
Accepted October 18, 2014.