
Aislamiento de cepas de traustochytridios en la zona costera de Puerto Montt, Chile y evaluación de la producción de ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA)

I. Hinzpeter¹, B. Quilodrán², R. Stead³, L. Trujillo⁴, J. Vidal¹, C. Shene⁵

¹Departamento de Gobierno y Empresa, Universidad de Los Lagos, Chile. ²Departamento de medio ambiente y Recursos Naturales, Universidad de Los Lagos, Chile. ³IMAR, Universidad de Los Lagos, Chile. ⁴Departamento de alimentos, Universidad de Los Lagos, Chile. ⁵Departamento de Ingeniería Química y Unidad de Tecnología y Procesos, Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Isolation of thraustochytrid strains in the coastal zone of Puerto Montt, Chile and evaluation of Docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) production

Aïllament de soques de traustochytridies en la zona costanera de Puerto Montt, Xile, i avaluació de la producció d'àcid docosahexaenoic (C22:6n-3, DHA)

Recibido: 3 de febrero de 2009; revisado: 23 de septiembre de 2009; aceptado: 15 de octubre de 2009

RESUMEN

Cuarenta y seis cepas que presentaron las características morfológicas descritas para traustochytridios fueron aisladas desde muestras colectadas en cinco localidades de la zona costera de Puerto Montt, Chile, utilizando la técnica de polen de pino. Las 16 cepas que mostraron el perfil característico de tres bandas cuando el ADN fue amplificado con un conjunto de tres cebadores (FA1RA1, FA2RA2 y FA3RA3) diseñados para estos microorganismos⁽¹⁷⁾, fueron cultivadas en medio líquido para evaluar la producción de ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA). El cultivo se realizó en matraces de Erlenmeyer agitados y la composición del medio basal fue: glucosa 10 g/L, extracto de levadura 4 g/L, en agua de mar diluida al 70%. Sólo 6 cepas produjeron lípidos en los que se detectó DHA; los mayores contenidos de DHA en los ácidos grasos totales y de DHA en la biomasa fueron 46,4% (cepa G4) y 36,2 mg/g (cepa M12-X1), respectivamente. El análisis de filogenia molecular basado en el alineamiento de la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal (18S rRNA) confirmó que las tres cepas nativas que producen DHA pertenecen al *phylum* Labyrinthulomycota. Pruebas preliminares demostraron que es posible incrementar la concentración de biomasa (83%), el contenido de DHA en la biomasa (153%) y la concentración de DHA (71%) a través de la inclusión de glutamato monosódico en el medio de cultivo basal.

Palabras clave: protista marino; traustochytridios; 18S rRNA; ácido docosahexaenoico; ácidos grasos poliinsaturados.

SUMMARY

Forty six strains that displayed thraustochytrid's morphological characters were isolated from five different sites

at coastal zone, Puerto Montt, Chile. Molecular analysis using a set of primers designed based on 18S rDNA sequence alignment of known *Thraustochytrium* strains⁽¹⁷⁾ was used for screening sixteen strains that were cultivated (glucose 10 g/L, yeast extract 4 g/L, in artificial sea water diluted to 70%) in rotary-shaken Erlenmeyer flasks. Docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) was detected in the lipids from biomass of six strains. Different strains presented the highest DHA content in the total fatty acids (46.4%, G4 strain) and the highest DHA content in the dry biomass (36.2 mg/g, M12-X strain). The 18S rDNA sequence alignment confirmed that three of the DHA producer strains belong to the phylum Labyrinthulomycota. Preliminary tests carried out with one of the isolated strains showed that through addition of monosodium glutamate to basal growth medium biomass concentration, DHA content in the biomass and DHA concentration can be increased by 83%, 153% and 71%, respectively.

Key words: marine protist; thraustochytrids; 18S rDNA; docosahexaenoic acid; polyunsaturated fatty acids.

RESUM

S'aïllen quaranta-sis soques que presenten les característiques morfològiques descrites per als traustochytridies partir de mostres recol·lectades en cinc localitats de la zona costanera de Puerto Montt, Xile, utilitzant la tècnica de pol·len de pi. Les 16 soques que mostren el perfil característic de tres bandes en amplificar el ADN amb un conjunt de tres encebadors (FA1RA1, FA2RA2 i FA3RA3) dissenyats per a aquests microorganismes⁽¹⁷⁾, es cultiven en medi líquid per avaluar la producció d'àcid docosahexaenoic (C22:6n-3, DHA). El cultiu es realitza en matrassos

Autor de correspondencia. Teléfono: 56 45 325491. Fax: 56 45 325053. cshene@ufro.cl

d'Erlenmeyer agitats, essent la composició del medi basal: glucosa 10 g/L, extracte de llevat 4 g/L, en aigua de mar diluïda al 70%. Només 6 soques produeixen lípids en els que es detecta DHA; els majors continguts de DHA en els àcids grassos totals i de DHA en la biomassa són 46,4% (soca G4) i 36,2 mg/g (soca M12-X1), respectivament. La anàlisi de filogènia molecular basat en el alineament de la seqüència del gen que codifica per al ARN de la subunitat menor ribosòmic (18S rRNA) confirma que les tres soques natives que produeixen DHA pertanyen al phylum Labyrinthulomycota. Les proves preliminars realitzades demostren que és possible incrementar la concentració de biomassa (83%), el contingut de DHA en la biomassa (153%) i la concentració de DHA (71%) mitjançant la inclusió de glutamat monosòdic en el medi de cultiu basal.

Mots clau: protist marí; traustocitridis; 18S rRNA; àcid docosahexaenoic; àcids grassos poliinsaturats.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pertenecientes al phylum Labyrinthulomycota se encuentran en diversos ambientes marinos y estuariales⁽¹⁾. Aunque estos protistas han sido reportados en diferentes habitats (superficie de algas, detritus marino, fitoplancton e invertebrados), se concentran preferentemente en la columna de agua y en sedimentos⁽²⁾. La mayor parte de la bibliografía señala que generalmente se encuentran asociados a material vegetal en descomposición, especialmente algas y hojas de mangles⁽³⁾. Los representantes del phylum Labyrinthulomycota han atraído el interés debido a su capacidad de sintetizar *de novo* ácidos grasos poli-insaturados (AGPIs) de cadena larga⁽⁴⁾ representando un sistema de producción microbiano, alternativo al aceite de pescado⁽⁵⁾.

La clase Labyrinthulomycetes está compuesta por dos familias, Thraustochytriaceae (traustocitridios) y Labyrinthulaceae (labirintúlidos). Los labirintúlidos se caracterizan por células rodeadas por una red ectoplasmática. Las células de los traustocitridios pueden encontrarse aisladas o agrupadas sin interconexiones; poseen una pared formada por múltiples capas delgadas de polisacáridos⁽⁶⁾ y sus esporas son biflageladas. El esporangio puede presentar uno o más cuerpos de proliferación o carecer de ellos.

Hasta ahora se han descritos seis géneros de traustocitridios: *Althornia*, *Ulkenia*, *Japonochoytrium*, *Aplanochoytrium*, *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*. El género *Althornia* carece de la red ectoplasmática. En representantes del género *Ulkenia*, el citoplasma es liberado del esporangio como una masa ameboides que se cliva para formar las esporas⁽⁷⁾. Las células del género *Japonochoytrium* poseen una apófisis distintiva⁽⁸⁾. Las cepas del género *Aplanochoytrium*, se caracterizan por producir aplanosporas y porque las células vegetativas presentan movilidad⁽⁹⁾. Los miembros del género *Schizochytrium* se reproducen además por la bipartición de células vegetativas formando diadas, tétradas y agrupamientos mayores.

Debido a la plasticidad morfológica de los géneros, la morfología no es suficiente para su caracterización, aun cuando en la búsqueda de nuevas cepas de traustocitridios, la primera etapa es la caracterización morfológica. El análisis de la filogenia molecular utilizado para explicar las relaciones evolutivas y taxonómicas puede ayudar a la identificación de nuevas cepas. Rasgos morfológicos

como la división binaria sucesiva ha sido reevaluada a la luz de estudios de filogenia molecular y se ha propuesto que este aspecto habría sido adquirido por varios linajes. Actualmente se propone que el género *Schizochytrium* se divide en tres géneros diferentes *Schizochytrium* sensu stricto, *Aurantiochytrium* y *Oblongichytrium*⁽¹⁰⁾.

Los traustocitridios son estudiados principalmente por su capacidad de producir AGPI de cadena larga, siendo el de principal interés el ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA) cuyo consumo está asociado a numerosos efectos positivos para la salud de seres humanos y animales. El contenido de DHA en algunas cepas de *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* se encuentra entre 25 y 60% de los ácidos grasos totales (AGT), dependiendo de la cepa y de las condiciones de cultivo⁽¹¹⁾. El perfil de AGPIs ha sido sugerido también como una estrategia para agrupar traustocitridios ya que se ha encontrado que este carácter presenta una fuerte correlación con los linajes filogenéticos basados en la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA⁽¹²⁾. El perfil de pigmentos carotenoides también está siendo utilizado para fines de agrupamiento en forma complementaria a las otras características mencionadas y una reclasificación del género *Ulkenia* ha sido realizada combinando diferentes criterios⁽¹³⁾.

En este trabajo se describe la caracterización de cepas de traustocitridios aisladas desde muestras de agua y sedimentos, colectadas en la zona costera de Puerto Montt, Chile, capaces de producir DHA. Para la caracterización se utilizó en forma secuencial la selección inicial de aislamientos en base a rasgos morfológicos, el análisis molecular y la capacidad de producir DHA en cultivo líquido. Para la cepa seleccionada como mejor productora de DHA se realizó una prueba preliminar para evaluar el efecto de la adición de glutamato de sodio al medio de cultivo, sobre el crecimiento y producción de DHA. Este trabajo tiene relevancia ya que constituye la primera etapa en la búsqueda de nuevas cepas de traustocitridios que puedan ser utilizadas para la producción biotecnológica de DHA en Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y aislamiento de microorganismos.

Muestras de agua y sedimentos fueron colectadas desde cinco lugares [Coihuin (41°30'52"S y 72°52'18"W), Chinquihue (41°29'42"S y 72°59'12"W), Panitao (41°34'32"S y 73°05'01"W), Huito (41°42'57"S y 73°09'09"W) y Cochamó (41°29'51"S y 72°17'49"W)] en la zona costera de Puerto Montt, sur de Chile. Durante el periodo de muestreo el promedio de salinidad y temperatura del agua fue de 30‰ y 12,9 ± 2,7°C, respectivamente. El aislamiento se realizó por la técnica de incubación con polen de pino⁽¹⁴⁾; las muestras (10 mL) con polen de pino (10 mg) fueron incubadas entre 3 y 10 días a 20°C. La presencia de microorganismos adheridos al polen de pino fue verificada por inspección en microscopio óptico (Zeiss, Standard 20, Alemania). Los granos de polen de pino con microorganismos adheridos fueron separados por filtración (filtro de nailon, 20 µm) y cultivados sobre medio de cultivo sólido (B) [extracto de levadura (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) 2 g/L, peptona (Oxoid) 2 g/L, y agar (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, EE.UU) 10 g/L] preparado en agua de mar diluïda (70%). Para eliminar la flora bacteriana, estreptomocina y penicilina G (Sigma-

Aldrich Co., Steinheim, Alemania) fueron adicionados para obtener una concentración final de 0,3 g/L de cada uno. La incubación se realizó a 25°C. Las colonias seleccionadas fueron subcultivadas en medio B hasta obtener aislamientos puros.

Cultivo en medio líquido.

El medio B (sin agar) suplementado con glucosa (Sigma, 10 g/L) fue utilizado para el cultivo de las cepas aisladas. El inóculo fue preparado transfiriendo colonias desde placas a 50 mL de medio de cultivo estéril. La incubación se realizó a 25°C por 48 h en un agitador orbital (180 rpm). El material obtenido se utilizó para inocular (10% v/v, densidad óptica del inóculo 0,6 a 600 nm) frascos Erlenmeyer (250 mL) que contenían 50 mL de medio, los que se incubaron por 72 h bajo las mismas condiciones. La biomasa fue separada por centrifugación (4500g, 10 min); el precipitado fue lavado dos veces con agua desionizada y liofilizado, determinándose gravimétricamente la concentración de biomasa seca. Los resultados corresponden al promedio de experimentos realizados por triplicado.

Análisis de ácidos grasos.

Muestras de biomasa liofilizada (20 a 50 mg) fueron utilizadas para transesterificación directa⁽¹⁵⁾. Los metil-ésteres de ácidos grasos (MEAG) extraídos en hexano fueron separados por centrifugación (1000g y 4°C) y analizados en un equipo de CG (FOCUS-Finnigan)/EM (DSQ-Finnigan), equipado con columna capilar HP Ultra (30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno). La temperatura de la columna fue programada desde 40 hasta 300°C con una velocidad de incremento de 5°C/min. Se utilizó un detector de ionización de llama con gas helio como transportador (200°C). El inyector fue mantenido a 250°C y el volumen de inyección fue de 1 µL. Los picos de los MEAG fueron identificados y cuantificados utilizando un estándar de ácidos grasos (Mix L209, FAME C20:0, C20:1, C20:4, C22:1, C22:6) suministrados por Alltech (EE.UU).

Extracción de ADN y ensayos de PCR.

Células colectadas desde las placas de agar fueron suspendidas en agua destilada (200 µL) y centrifugadas (8000g, 5 min a 4°C). El precipitado fue resuspendido con buffer de lisis (200 µL; 0,25 M Tris-Cl; 0,1 M Na₂-EDTA; 2% p/v SDS; 0,1 M NaCl a pH 8,2). El ADN fue extraído con fenol/cloroformo/isoamil alcohol y precipitado con etanol⁽¹⁶⁾. Se amplificaron regiones parciales del gen 18S rRNA por PCR utilizando los cebadores FA1RA1, FA2RA2 y FA3RA3⁽¹⁷⁾. El programa cíclico de amplificación (Termo electron Corporation, EE.UU) fue: desnaturalización por 3 min a 95°C, 35 ciclos de amplificación de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C, con 10 min de extensión de etapa de elongación. Los productos de PCR fueron visualizados sobre un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

Secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenético.

Se amplificó la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA por PCR utilizando los cebadores JVF (5'-TTGATCCTGCCAGTAGT-CATAT-3') y JVR (5'-CAAACCTTGTTACGACTTCA-3'). Los productos de PCR fueron purificados utilizando el Kit de Extracción V-Gene (Biochtechnology Ltd, Zhejiang, China) secuenciados en un equipo (ABI-3100, Applied Biosystem, California, EE.UU) utilizando los cebadores de Mo et

al.⁽¹⁷⁾ como cebadores internos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas disponibles en la base de datos del Banco de Genes (National Center for Biotechnology Information, USA: NCBI Home page <http://www.ncbi>). La búsqueda de las secuencias homologas más relacionadas fue realizada utilizando el programa BLAST⁽¹⁸⁾ disponible en el servidor web NCBI. Las secuencias determinadas en este trabajo fueron alineadas con otras secuencias del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA de organismos relacionados obtenidas desde el Banco de Genes NCBI, utilizando el programa Clustal X (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>)⁽¹⁹⁾. Las posiciones con bases indeterminadas o ambiguas fueron removidas para los análisis siguientes. El árbol filogenético fue generado utilizando el método de máxima verosimilitud (MV)⁽²⁰⁾ con el programa PAUP ver.4.0b10⁽²¹⁾. Las distancias fueron calculadas con el modelo HKY85⁽²²⁾. *Prorocentrum micans* y *Ochromonas danica* fueron seleccionados como grupo externo. El soporte de los nodos (valor de *bootstrap*) se calculó a partir de 1000 submuestras⁽²³⁾.

RESULTADOS

Aislamiento de cepas nativas de traustochytridios

Las cepas aisladas fueron examinadas al microscopio encontrándose que 46 de ellas presentaron rasgos morfológicos atribuibles a traustochytridios. El ADN de estas cepas fue amplificado usando un conjunto de tres cebadores⁽¹⁷⁾ y como resultado, 16 de las cepas presentaron el perfil de tres bandas con tamaños entre 550 y 700 bp. De acuerdo a esta estrategia, estas 16 cepas podrían ser identificadas como miembros de Labyrinthulomycota a la que pertenecen los traustochytridios. Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en medio líquido y en los lípidos de 6 de ellas se detectó DHA.

Las colonias de las 6 cepas productoras de DHA presentaron variados colores [rosado (cepas H41 y AS2-B), amarillo (cepa G4), blanco (cepa M12-X1) y crema opaco (cepas C41 y B4)] y diferencias en la textura [aspecto cremoso (M12-X1, AS2-B, B4) y colonias duras (C41, G4, H41)]. Se observó que las colonias de la cepa B4 penetraban el agar a diferentes profundidades y que además formaban redes con células de tamaño pequeño. La cepa C41 se caracterizó por un esporangio de aspecto granular con 2, 3 o 4 divisiones en las diferentes etapas de desarrollo; zoosporas móviles en la periferia de las células agrupadas fueron visualizadas. Para esta cepa el esporangio alcanzó tamaños de 20 µm observándose que las células vegetativas poseían paredes delgadas con inclusiones. En medio líquido las células tendían a aglomerarse y a formar precipitado. En medio sólido las células de la cepa G4 aparecieron agrupadas con colonias levemente irregulares. La cepa H41 mostró un esporangio granular con células vegetativas pequeñas; se visualizó la formación de diadas y tétradas al igual que en las células de la cepa AS2-B. El esporangio de la cepa M12-X1 exhibió diferentes tamaños (< 40 µm) y en algunos casos el material intracelular se encontró distribuido en forma desigual, con aspecto granular y divisiones propias de las diferentes etapas de desarrollo. La forma del esporangio varió desde piriforme a ovalado tal como se describe para *Thraustochytrium kinnei*⁽²⁴⁾. La Tabla 1 resume las características morfológicas más relevantes (forma y tamaño del esporangio, cuerpos de proliferación, zoosporas etc.) de las seis cepas productoras de DHA.

Tabla 1. Aspectos morfológicos más relevantes de las cepas de traustoguitridios productoras de DHA aisladas de la zona Costera de Puerto Montt, Chile.

Aspectos morfológicos	Cepas					
	B4	H41	AS2-B	G4	C41	M12-X1
Tamaño colonia (mm de diámetro)	-	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
Textura	blanda	blanda	blanda	blanda	dura	dura
Color colonia	crema opaco	rosado	rosado	amarillo	crema opaco	blanco
Forma de zoosporas	-	ovoide	ovoide	-	ovoide	ovoide
Forma/tamaño del esporangio	Esférico/5-10 µm	Esférico/5-10 µm	Esférico/5-20µm	Esférico/5-10 µm	Ovalado/5-20 µm	Ovalado/10-40 µm
Cuerpos de proliferación	-	-	-	-	+	+
División binaria	-	+	-	-	+	-
Red ectoplasmática	detectable	no detectable	no detectable	detectable	no detectable	no detectable
Permanencia de la pared celular después liberación de zoosporas	N.O.	-	+	N.O.	-	+

N.O. no observado

Tabla 2. Concentración de biomasa y de ácidos grasos producidos por las cepas nativas de traustoguitridios cultivadas en medio basal.

cepas	Biomasa (g/L)	DHA en biomasa (mg/g)	Perfil AG (% p/p)									
			14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	18:01	20:04	20:05	22:06	otros
B4	0,03 ± 0,05	3,2 ± 0,5	5,1	19,7	28,1	-	4,2	-	-	-	10,2	32,7
H41	0,08 ± 0,01	7,1 ± 0,2	-	9,2	6,0	6,0	-	-	-	-	16,3	32,4
AS2-B	0,38 ± 0,06	8,7 ± 1,3	7,9	7,0	37,6	-	6,1	20,1	-	-	10,4	10,9
G4	0,11 ± 0,03	11,6 ± 1,3	-	-	9,4	-	-	-	-	-	46,4	74,3
C41	0,57 ± 0,04	28,4 ± 2,0	-	-	24,4	-	-	-	18,2	-	24,8	32,6
M12-X1	0,89 ± 0,03	36,2 ± 0,5	4,3	7,7	20,9	-	-	-	-	12,8	44,0	10,3

Producción de DHA durante el cultivo en medio líquido

Las dieciséis cepas nativas fueron cultivadas en medio líquido con glucosa como fuente de carbono. El DHA sólo fue detectado en los lípidos extraídos desde la biomasa de seis cepas (B4, H41, AS2-B, G4, C41 y M12-X1) (Tabla 2). La cepa G4 presentó un alto contenido de DHA en los AGT (46,4%), mientras que el mayor contenido de DHA por unidad de masa de la biomasa seca (36,2 mg/g) fue el de la cepa M12-X1. El ácido palmítico (C16:0, PA) fue detectado en los lípidos de las 6 cepas y los ácidos araquidónico (C20:4n-6, ARA) y eicosapentaenoico (C20:5n-3, EPA) fueron detectados sólo en los lípidos producidos por las cepas C41 y M12-X1, respectivamente.

La mayor concentración de biomasa (0,89 g/L) se obtuvo en el cultivo de la cepa M12-X1; por esta razón la cepa M12-X1 fue seleccionada para evaluar el efecto de la adición del GMS en la producción de DHA (Tabla 3). La mayor concentración de biomasa (1,63 g/L) se obtuvo al suplementar el medio de cultivo basal con GMS en concentración de 2 g/L. Sin embargo, bajo esta condición el porcentaje de DHA en los AGT disminuyó desde 44,3 a 20,0% (Tabla 3). Por el contrario, se observó un aumento del contenido de DHA en la biomasa al incrementar la concentración del GMS desde 0 a 10 g/L, el que fue atribuido al incremento en el contenido de lípidos en la biomasa (datos no mostrados). En términos productivos el mejor resultado se obtuvo al utilizar una concentración de GMS de 10 g/L, alcanzándose una concentración de DHA de 109,2 mg/L.

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

La secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA de tres de las cepas productoras de DHA (C41, M12-X1 y H41) fue secuenciado. La Figura 1 muestra el árbol filogenético generado por el método MV utilizando las secuencias obtenidas y aquellas de cepas conocidas. Las cepas productoras de DHA se ubicaron entre microorganismos pertenecientes al phylum Labyrinthulomycota. Las cepas C41 y H41 presentaron similitudes a *S. minutum* (97%) y *Schizochytrium sp* (87%), respectivamente. La cepa M12-X1 presentó similitud con *T. kinnei* (99%).

Tabla 3. Efecto de la concentración del glutamato monosódico (GMS) sobre la concentración de biomasa y DHA, DHA en los AGT y DHA en la biomasa seca producida por la cepa M12-X1.

GMS (g/L)	Biomasa (g/L)	DHA en AGT (%)	DHA en biomasa (mg/g)	DHA (g/L)
0	0,89 ± 0,03	44,3	36,2 ± 0,5	32,2 ± 0,9
2	1,63 ± 0,10	20,0	38,5 ± 0,0	62,8 ± 5,4
4	1,44 ± 0,02	21,4	62,4 ± 10,5	89,9 ± 19,6
10	1,20 ± 0,09	25,2	91,6 ± 7,5	109,9 ± 1,1
20	0,42 ± 0,09	25,2	86,6 ± 4,2	36,4 ± 8,5

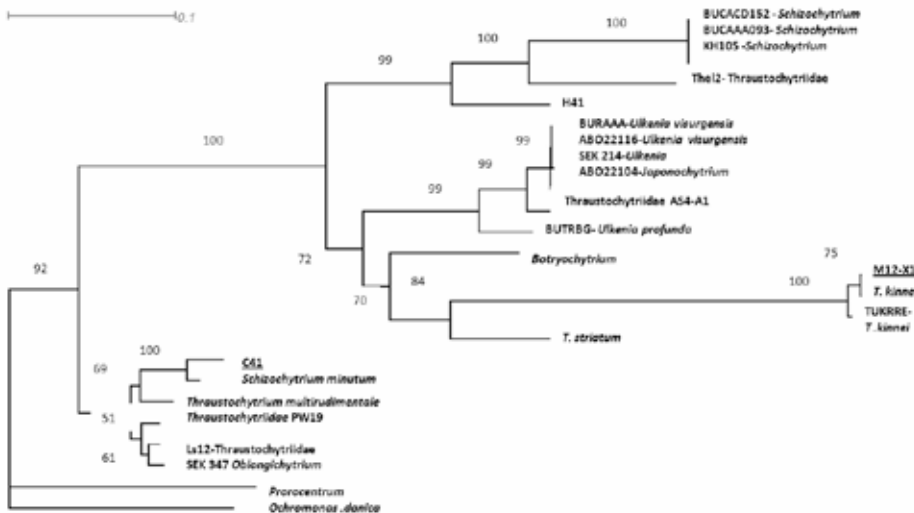


Figura 1. Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes 18S rDNA de cepas del Phylum Labyrinthulomycota con *P. micans* y *O. danica* como grupo externo. El mejor árbol generado a través del método de Máxima Verosimilitud (Maximum-likelihood, ML) (log-likelihood = -133766,32608) con el modelo HKY85 (relación $t/tv = 1,071671$). Los números en nodo muestran los valores de soporte del bootstrap (>50%) de 1000 réplicas.

DISCUSIÓN

Los microorganismos marinos pertenecientes a Thraustochytriales presentan un potencial biotecnológico por su capacidad de producir AGPI específicamente DHA, el cual es conocido por numerosos beneficios en la salud humana y animal. Junto a la optimización de los procesos biotecnológicos es necesario continuar en la búsqueda de cepas de traustochitridios capaces de producir DHA y otros compuestos de interés.

Inicialmente la identificación de estos microorganismos se realizaba a través de sus características morfológicas. No obstante, al evaluarlas a nivel de género, muchas de estas características se traslapan, haciendo que pierda validez la clasificación morfológica. Además, algunos cambios morfológicos son función de las condiciones de cultivo^(24,25,10,13). El surgimiento de los estudios de filogenia molecular ha mostrado que no existe coincidencia con algunos rasgos morfológicos y ciertos linajes filogenéticos por lo que los criterios actuales debieran ser reevaluados y complementados con la capacidad de producir ciertos AGPI y pigmentos carotenoides^(12,13).

En el presente trabajo el análisis molecular, basado en la amplificación del ADN utilizando cebadores que representan la región conservada 18S rDNA de traustochitridios fue utilizado como un criterio de selección de las cepas que presentaron algunas de las características morfológicas descritas para estos microorganismos. Esta metodología utilizada previamente por otros investigadores⁽¹⁷⁾ permitió reducir el tiempo dedicado a la selección de cepas. De esta forma el número de cepas evaluadas en términos de capacidad de producción de DHA en cultivo líquido fue reducido a un 35%.

Aun cuando el 13% de las cepas aisladas producen DHA, algunas de ellas presentan un bajo crecimiento durante el cultivo en medio líquido y/o un bajo porcentaje de DHA en los AGT. La baja concentración de biomasa es comparable a aquella reportada para traustochitridios aislados de ambientes fríos⁽²⁶⁾ con característica similares a la de los lugares considerados en este trabajo. No obstante, una elevada proporción de DHA en los AGT es característica de cepas que provienen de ambientes fríos⁽²⁶⁾ y en dos de las cepas aisladas, el DHA representa más del 40% de los AGT.

La producción de DHA a través del cultivo de traustochitridios podría ser modificada a través de cambios en las condiciones de cultivo, las que afectan la concentración de biomasa, el contenido de lípidos y el contenido de DHA en los lípidos. Los resultados preliminares demuestran que para la cepa que exhibe la mayor producción de DHA (M12-X1) es posible incrementar la producción de biomasa (1,63 g/L), el contenido de DHA en la biomasa (91,6 mg/g) y la concentración de DHA (109,2 mg/L) a través de la adición de GMS al medio de cultivo basal usado en este trabajo. Iida *et al.*⁽²⁷⁾ sugieren que el GMS como el componente más importante en el medio de cultivo y en general, la fuente de nitrógeno orgánico mejor aceptada por diferentes cepas de traustochitridios. Los estudios para optimizar la composición del medio de cultivo (micro y macro nutrientes) y las condiciones de cultivo (temperatura, pH, agitación y aireación) para esta cepa nativa se están realizando actualmente en nuestro laboratorio.

CONCLUSIONES

La caracterización de cepas de traustochitridios aislados desde la zona costera de Puerto Montt es el primer estudio de estos microorganismos marinos heterotróficos con un alto potencial biotecnológico realizado en Chile. Cuarenta y seis cepas que presentaron características morfológicas descritas para traustochitridios fueron aisladas desde muestras colectadas de cinco localidades de la zona costera de Puerto Montt utilizando la técnica del polen de pino. De entre éstas se seleccionaron las 16 cepas que mostraron el perfil característico de tres bandas cuando el ADN fue amplificado con el conjunto de tres cebadores (FA1RA1, FA2RA2 y FA3RA3) diseñados para estos microorganismos⁽¹⁷⁾. Las 16 cepas fueron cultivadas en medio líquido para evaluar su capacidad para producir DHA. Sólo seis cepas produjeron lípidos en los que se detectó DHA. A través del cultivo la cepa seleccionada como mejor productora (M12-X1) en medio suplementado con glutamato monosódico (GMS en concentración de 10 g/L) fue posible incrementar en un 71% la concentración de DHA.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo formó parte de la Tesis Doctoral de I Hinzpeter en el Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Los autores agradecen el financiamiento proporcionado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Los Lagos, Proyecto interno 2004 y MECESUP a través de los proyectos 000504 y MECESUP ULA 0202, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lewis, T.E.; Nichols, P.D.; Mc Meekin, T.A.: The biotechnological potential of Thraustochytrids. *Mar Biotechnol*, **1**: 580-587; 1999.
2. Raghukumar, S.; Anil, A.C.; Khandeparker, L.; Patil, J.S.: Thraustochytrids protists as a component of marine microbial films. *Mar Biol* **136**: 603-609; 2000.
3. Raghukumar, S.: Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Europ J Protistol*. **38**: 127-145; 2002.
4. Kumon, Y.; Yokoyama, R.; Yokochi, T.; Honda, D.; Nakahara, T.: A new labyrinthulid isolate; which solely produces n-6 docosapentanoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**: 22-28; 2003.
5. Bailey, R.B.; DiMasi, D.; Hansen, J.M.; Mirrasoul, P.J.; Ruecker, C.M.; Veeder, G.M.; Kaneko, T.; Barclay, W.R.: Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. US Patent 6;607;900; 2003.
6. Leander, C.A.; Porter, D.; Leander, B.S.: Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *Eur J Protistology*, **40**: 317-328; 2004.
7. Fan, K.W.; Vrijmoed, L.L.P.; Jones, E.B.G.: Physiological studies of subtropical mangrove Thraustochytrids. *Mar Bot*, **45**: 50-57; 2002.
8. Sparrow, F.K.: Aquatic Phycomycetes. The University of Michigan Press; Ann Arbor; 1960.
9. Leander, C.A.; Porter, D.: Redefining the genus *Aplanochytrium* (phylum Labyrinthulomycota). *Mycotaxon*, **76**: 439-444; 2000.
10. Yokoyama, R.; Honda, D.: Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, **48**: 199-211; 2007.
11. Yaguchi, T.; Tanaka, S.; Yokochi, T.; Nakahara, T.; Higashihara, T.: Production of high yields of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *J Am Oil Chem Soc*, **74**: 1431-1434; 1997.
12. Huang, J.; Aki, T.; Yokochi, T.; Nakahara, T.; Honda, D.; Kawamoto, S.; Shigetani, S.; Ono, K.; Suzuki, O.: Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing thraustochytrids based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18S rRNA genes. *Mar Biotechnol*, **5**: 450-457; 2003.
13. Yokoyama, R.; Salleh, B.; Honda, D.: Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia sensu lato* based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium* and *Sicydochytrium* gen. nov. *Mycoscience* **48**: 329-341; 2007.
14. Bremer, G.B.: Lower marine fungi (Labyrinthulomycetes) and the decay of mangrove leaf litter. *Hydrobiologia*, **295**: 89-96; 1995.
15. Fan, K.W.; Chen, F.; Vrijmoed, L.L.P.: Eicosapentanoic and docosahexaenoic acid production by and Okara-utilizing potential of thraustochytrids. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **27**: 199-202; 2001.
16. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor; N.Y; 1989.
17. Mo, C.; Douek, J.; Rinkevich, B.: Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S r DNA sequence. *Mar Biol*, **140**: 883-889; 2002.
18. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J.: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**: 403-410; 1990.
19. Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G.: The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**: 4876-4882; 1997.
20. Saitou, N.; Nei, M.: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, **4**: 406-425; 1987.
21. Swofford, D.L.: PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods); Version 4. Sinauer Associates; Sunderland; MA; 2000.
22. Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T.A.: Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, **22**: 160-174; 1985.
23. Felsenstein, J.: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791; 1985.
24. Bongiorno, L.; Jain, R.; Raghukumar, S.; Aggarwal, R.K.: *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a new Thraustochytrid Stramenopilan protist from mangroves of Goa; India. *Protist*, **156**: 303-315; 2005.
25. Burja, A.M.; Radianingtyas, H.; Windust, A.; Barrow, C.J.: Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl Microbiol Biotechnol*. **72**: 1161-1169; 2006.
26. Bowles, R.D.; Hunt, A.E.; Bremer, G.B.; Duchars, M.G.; Eaton, R.A.: Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. *J Biotechnol*, **70**: 193-202; 1999.
27. Iida, I.; Nakahara, T.; Yokochi, T.; Kamisaka, Y.; Yagi, H.; Yamaoaka, M.; Suzuki, O.: Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. *J Fermentation and Bioeng*, **1**: 76-78; 1996.