

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS EXTRACELULARES PRODUCIDOS POR CULTIVOS AXENICOS DE *CHLORELLA KESSLERI* (*CHLOROCOCCALES*, *CHLOROPHYCEAE*)

Por ANGELA B. JUAREZ y JUAN ACCORINTI<sup>1</sup>

**Summary** Antimicrobial activity of extracellular compounds from *Chlorella kessleri* (Chlorococcales, Chlorophyceae) axenic cultures. *Chlorella kessleri* Fott et Novakova is the dominant algal species in the thermal pond «Laguna Verde». Comparative studies were carried out between cell-free pond water samples and filtrated culture media from axenic cultures of *Chlorella kessleri* grown under laboratory conditions. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* was obtained for the ether soluble fractions from pond water samples and cell-free culture medium at the exponential and stationary stages of growth. Pond water exhibited the highest activity. Paper and thin layer chromatography analyses of *Chlorella kessleri* axenic cultures indicated the presence of lipidic substances of terpenic nature.

### INTRODUCCION

Durante un relevamiento de distintos cuerpos de agua termales de la provincia del Neuquén, llamó nuestra atención el color verde intenso que presentaban las aguas de la «Laguna Verde» (Complejo Termal Copahue). En un trabajo reciente, Juárez y Vélez (1993) determinaron que esa coloración se debía a la presencia de altas concentraciones de la microalga verde *Chlorella kessleri* Fott et Novakova (*Chlorococcales*, *Chlorophyceae*), especie dominante en este cuerpo de agua.

Las aguas de la «Laguna Verde» son utilizadas con fines terapéuticos, principalmente en el tratamiento de afecciones cutáneas como psoriasis, candidiasis, etc. (Ubogui *et al.*, 1991). Esto resultó de nuestro interés y encaramos el estudio de las propiedades antibióticas de sus aguas y de las sustancias liberadas al medio de cultivo por la especie algal dominante en el fitoplancton de dicha laguna.

Numerosos autores han realizado evaluaciones «in vitro» de la producción de principios antimicrobianos en diversas especies de algas verdes (Fogg, 1971; Pesando & Gnassia-Barelli, 1979; Accorinti, 1981 y 1983; Reichelt & Borowitzka, 1984). Sin embargo, en la bibliografía, no se registran ensayos de antibiosis con clorofitas de áreas termales.

El objetivo de este trabajo fue ensayar, en pruebas de laboratorio, la actividad biológica frente a bacterias y hongos patógenos de compuestos extracelulares producidos por cultivos axénicos de *Chlorella kessleri*, y establecer una posible relación entre la bioactividad de esos metabolitos y la de las aguas de la Laguna Verde.

### MATERIALES Y METODOS

Los materiales estudiados se recolectaron en la Laguna Verde (Complejo Termal Copahue, Neuquén) en enero de 1991. Las muestras de agua fueron tomadas «in situ», filtrando 20 l. a través de una red de 15 µm de malla. A su vez se tomaron pequeños volúmenes de muestras vivas para llevar a cabo los cultivos de *Chlorella kessleri*, la cual se aisló, purificó y cultivó axénicamente según Juárez y Vélez (1993).

Los cultivos axénicos se realizaron en erlenmeyers de 2.000 ml conteniendo 1.000 ml de medio 3NBBM (Archibald & Bold, 1970) suplementando con glucosa 0,1% (P/V) a temperatura ambiente y sometidos a un fotoperíodo de 12-12 L-O y agitación constante. Para determinar el momento óptimo de extracción de las sustancias activas, se siguió previamente el crecimiento de la especie bajo las condiciones mencionadas, tomando como parámetros de crecimiento densidad óptica a 600 nm y recuento celular en cámara de Neubauer.

La extracción de los productos extracelulares se realizó a los 4 y 35 días, cuando cada cultivo alcan-

<sup>1</sup> Laboratorios de Fisiología Vegetal, Dto. Cs. Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pab. 2, (1428) Buenos Aires, Argentina.

zó la fase de crecimiento exponencial y estacionaria respectivamente (indicado con flechas en la Fig. 1). Cada cultivo se filtró a través de filtro Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ , descartándose la fracción celular.

La secuencia de extracción de los metabolitos extracelulares, tanto para el agua de la laguna como para las soluciones de los cultivos axénicos, se realizó según Stahl y Schorn (1965), e involucró: 1) adsorción en columna de carbón activado; 2) elución secuencial de la columna con solventes de polaridad decreciente (metanol, acetato de etilo y éter sulfúrico); 3) concentración de los eluidos por evaporación al vacío, previa deshidratación con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro para el caso del extracto etéreo.

Los efectos antibióticos de cada extracto se evaluaron usando la técnica de antibiogramas de disco en cajas de Petri, frente a *Staphylococcus aureus* (aislamiento clínico del Lab. de Tuberculosis del Hospital Muñiz) y *Candida albicans* (cepa 1001, también ATCC 64385 del Dto. de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid). En todos los casos, se realizaron ensayos paralelos con el solvente de elución. La actividad antimicrobiana se determinó por la presencia y diámetro de los halos de inhibición. Las medidas están en la Tab. 1. Las fotografías fueron tomadas con una cámara fotográfica Pentax 1000.

El extracto etéreo del cultivo en fase estacionaria fue analizado, en forma preliminar, por cromatografía ascendente en papel y cromatografía ascendente en placa delgada (TLC).

Las cromatografías preparativas fueron desarrolladas de acuerdo a Smith (1963) en papel Whatman 3MM a temperatura ambiente, usando éter de petróleo: metanol: cloroformo (50: 5: 45) como sistema de solventes. En todos los casos, se corrieron cromatogramas paralelos para testear los productos de distinto  $R_f$  en biocromatogramas (Jorgensen, 1960; Accorinti, 1980), aplicando directamente la sección de papel cromatográfico correspondiente a cada  $R_f$  en antibiogramas. Las detecciones químicas de lípidos, ácidos orgánicos y ácidos grasos, se hicieron de acuerdo a Smith (*op. cit.*).

Las corridas en TLC fueron desarrolladas de acuerdo a Stahl (1965) en placas de sílica gel Merck 60 F<sub>254</sub>, usando como sistema de solventes tolueno: ác. acético (200: 30) (White & James, 1985). Las detecciones químicas de lípidos y terpenoides fueron realizadas de acuerdo a Stahl (*op. cit.*).

## RESULTADOS

El crecimiento de *Chlorella kessleri* (Fig. 1) respondió a la curva de crecimiento típica de cultivos de

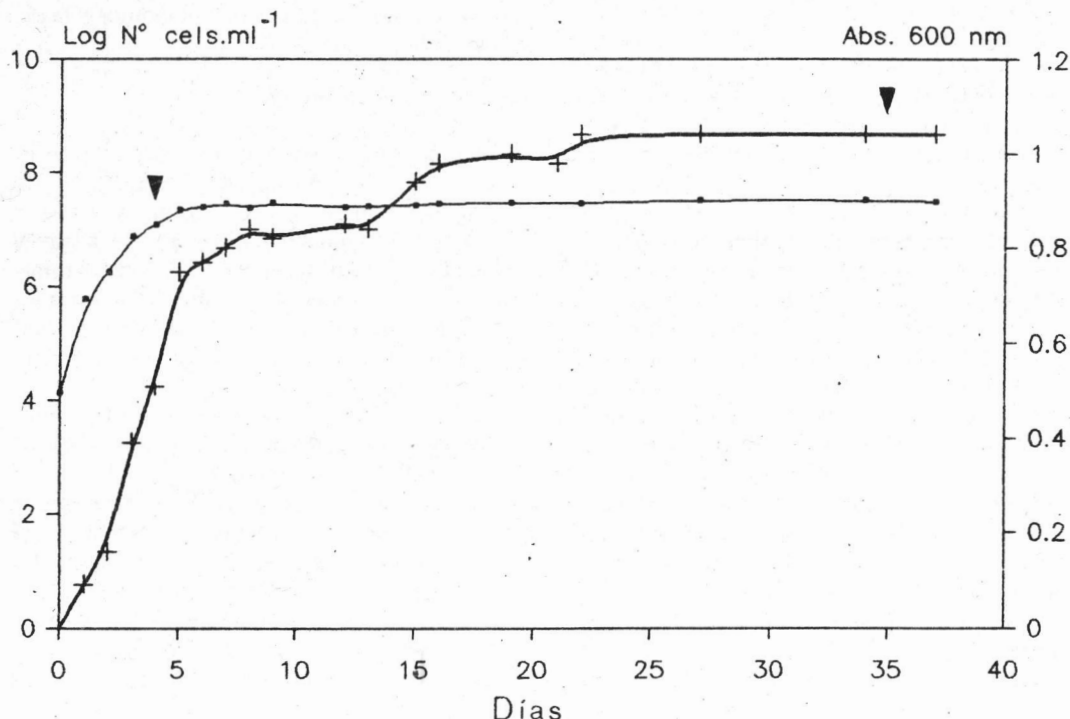


Fig. 1.— Crecimiento de *Chlorella kessleri* en función del tiempo. -+--+ : densidad óptica (Abs.); -.-.-.- : log. N° células. ml<sup>-1</sup>. Las flechas indican el momento de extracción.

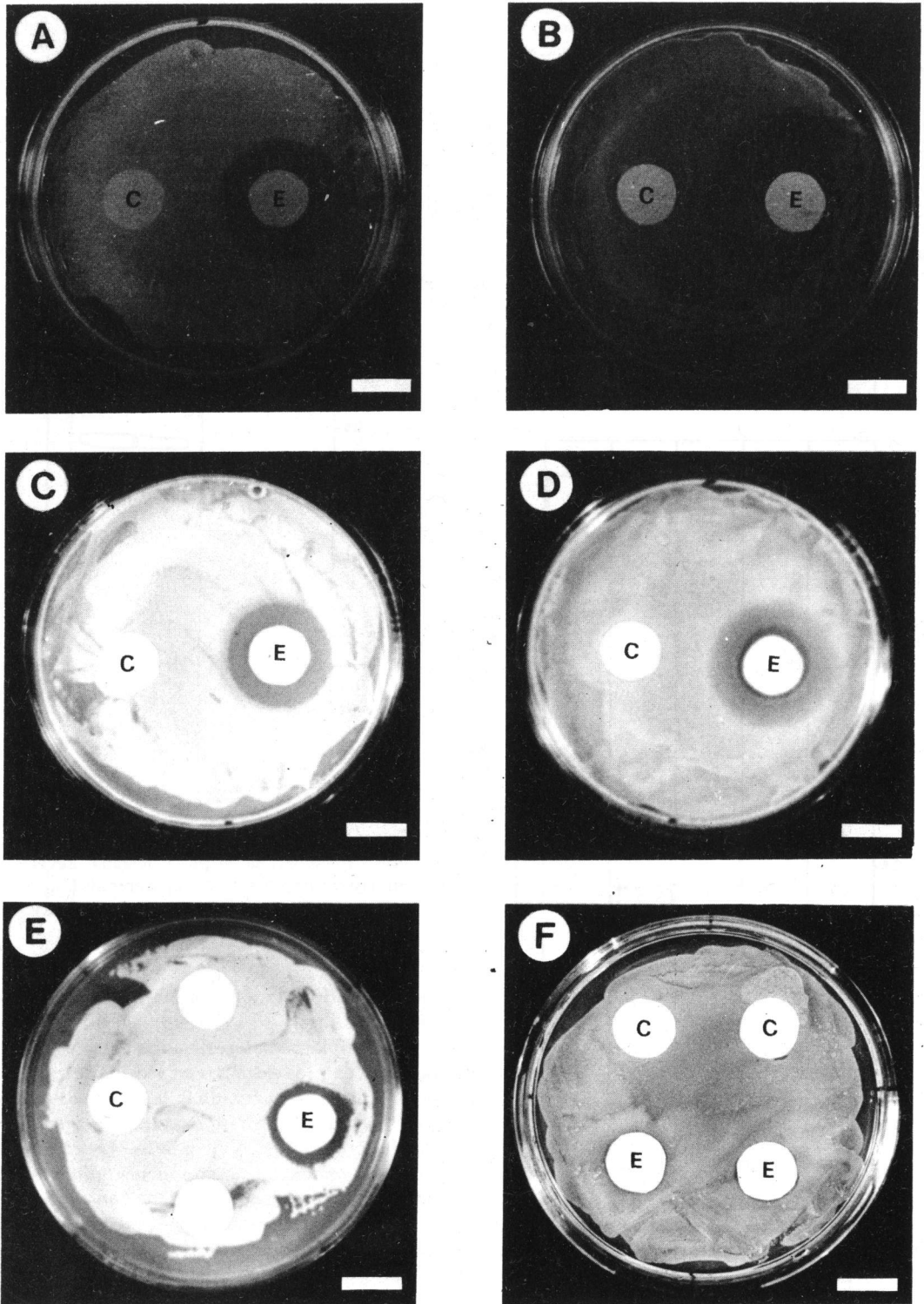


Fig. 2.—Antibiogramas de los distintos extractos etéreos. A y B: Agua de la Laguna Verde; C y D: cultivo en fase estacionaria; E y F: cultivo en fase exponencial. Organismos testeados: *C. albicans* (A, C y E) y *S. aureus* (B, D y F). E: extracto etéreo; C: control. Las escalas corresponden a 15 mm.

Tabla 1.— Antibiógramas de los distintos extractos etéreos. Se indica, en milímetros, el diámetro de los halos de actividad. A y B: agua de la Laguna Verde; C y D: cultivo axénico en fase estacionaria; E y F: cultivo axénico en fase exponencial; i: inhibición; b: bacteriostasis.

|   | <i>C. albicans</i> |   | <i>S. aureus</i> |
|---|--------------------|---|------------------|
| A | 30 mm i            | B | 38 mm i          |
| C | 24 mm i            | D | 17 mm i          |
|   |                    |   | 13 mm b          |
| E | 21 mm i            | F | 15 mm i          |

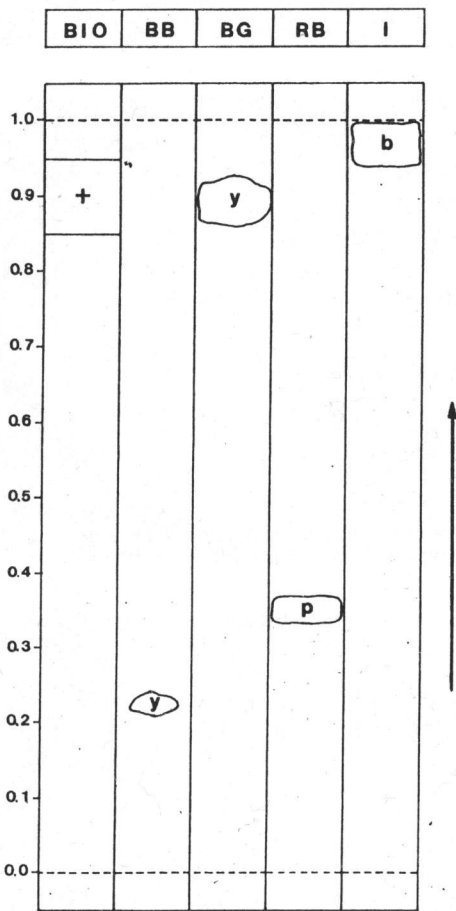


Fig. 3.— Cromatografía preparativa y biocromatogramas en Whatman 3MM. Reveladores: azul de bromofenol (BB); verde de bromocresol (BG); Rodamina B (RB); yodo (I). BIO: biocromatogramas; y: amarillo; p: púrpura; b: marrón; +: antibiosis positiva.

algas autótrofas (Myers, 1962). Se observó primero una fase exponencial (hasta el día 5), seguida de una fase estacionaria, no registrándose la fase lag

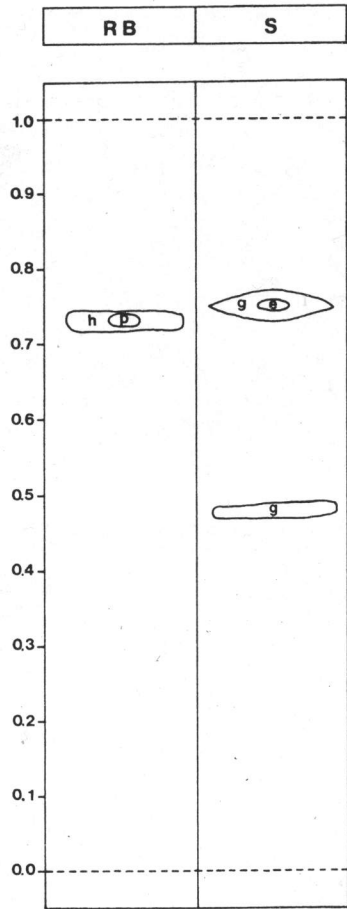


Fig. 4.— Cromatografía en placa delgada. Reveladores: Rodamina B (RB); ácido sulfúrico concentrado (S). p: púrpura; h: púrpura pálido; e: bordeau; g: marrón grisáceo.

inicial, debido a la alta concentración del inóculo sembrado.

Los antibiógramas realizados con los extractos metanólicos y los extractos en acetato de etilo, obtenidos a partir del agua de la laguna y de las soluciones de cultivo en fase exponencial y estacionaria, dieron resultados negativos. En cambio, los extractos etéreos presentaron una significativa actividad inhibitoria frente a *C. albicans* y *S. aureus* (Tab. 1). El extracto etéreo proveniente del agua de la laguna presentó la mayor actividad (Tab. 1 A y B, Fig. 2 A y B), seguido por el proveniente del cultivo en fase de crecimiento estacionaria (Tab. 1 C y D, Fig. 2 C y D), mientras que el obtenido del cultivo en fase exponencial dio como resultado los halos de inhibición menores (Tab. 1 E y F, Fig. 2 E y F). Además, el extracto etéreo proveniente del cultivo

en fase estacionaria presentó efectos antibacterianos y bacteriostáticos combinados frente a *S. aureus* (Tab. 1 D, Fig. 2 D).

Los análisis cromatográficos indicaron la presencia de sustancias con valores de Rf y propiedades cromogénicas similares a las correspondientes a ácidos orgánicos, lípidos, terpenoides y sustancias insaturadas (Figs. 3 y 4). La existencia de sustancias reductoras se evidenció por reacción con fuccina ácida.

Los biocromatogramas demostraron antibiosis frente a *S. aureus* en la zona de Rf: 0,85 a 0,95. De acuerdo con los reactivos ensayados, esta zona correspondería a ácidos orgánicos no saturados (Fig. 3).

## DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos afirmar que el agua de la «Laguna Verde» contiene principios bioactivos con propiedades antimicrobianas.

Como ha sido comprobado por diversos autores (Accorinti, 1980, 1981 y 1983; Hellebust 1974) las *Chlorococcales* producen una variada gama de metabolitos extracelulares que pueden inhibir el crecimiento de otras algas y microorganismos. Teniendo en cuenta los fenómenos de alelopatía (Rice, 1984), la acción de dichos metabolitos puede explicar, en parte, la dominancia de *Chlorella kessleri* en este cuerpo de agua.

Varios autores han demostrado «in vitro» la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos celulares y de soluciones de cultivo de distintas especies algales (Borowitzka, 1988). En nuestro caso, los ensayos de actividad biológica de las fracciones extracelulares de los cultivos axénicos de *C. kessleri* indicaron la producción y liberación de principios antimicrobianos. Estos principios podrían estar relacionados con los efectos curativos de las aguas naturales frente a ciertas dolencias epidérmicas como psoriasis, candidiasis, etc.

Dada la elevada concentración de *C. kessleri* en la laguna, del orden de  $2 \times 10^7$  cél./ml. (Juárez y Vélez, 1993), podemos suponer que el efecto antibiótico de las aguas naturales se debe en gran medida a la producción de principios activos por parte de esta especie algal. La mayor actividad antibiótica obtenida con los extractos provenientes del agua de la laguna, puede relacionarse con: el mayor volumen de agua filtrado «in situ», el mayor acúmulo natural de metabolitos bioactivos en función del tiempo, y la probable producción de sustancias extracelulares por parte de las especies concomitantes. Comparando los resultados obtenidos

con los extractos de cultivos en fase exponencial y estacionaria, se observa que el efecto inhibitorio frente a los dos microorganismos testeados fue mayor con el extracto del cultivo estacionario. Reportes previos indican que la producción de metabolitos extracelulares es mayor en cultivos envejecidos (Borowitzka, 1988; Allard & Tazi, 1993), probablemente relacionada con la deficiencia de nitrógeno y fósforo (Henriquez Vieira & Myklestad, 1986; Strycek *et al.*, 1992).

La actividad de sustancias lipídicas, terpenos y sesquiterpenos, ya ha sido señalada por numerosos autores (Accorinti, 1983 y 1987; Rice, 1984). La caracterización cromatográfica preliminar del extracto bioactivo de *Chlorella kessleri* indicó la presencia de sustancias lipídicas de tipo terpenoide. Estos resultados preliminares serán confirmados con un posterior análisis de las estructuras químicas involucradas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Dra. Nora Scutari por facilitarles los materiales para la realización de las cromatografías en placa delgada. Al E. PRO. TE. N (Ente Provincial de Termas del Neuquén) por la financiación del viaje de recolección. A la Universidad de Buenos Aires por el subsidio otorgado (Extensión del Proyecto N° EX 086). Parte de este trabajo fue realizado durante el período de Beca del CONICET de la Lic. Juárez.

## BIBLIOGRAFIA

- ACCORINTI, J. 1980. Ensayos de aislamiento e identificación de productos extracelulares biológicamente activos de cultivos axénicos de *Coelastrum proboscideum* var. *dilatatum* (Chlorophyta) III. *Phyton* 39: 21-35.
- . 1981. Inhibidores antibacterianos y de otros microorganismos producidos por algas Chlorococcales. *Physis* (Buenos Aires), Secc. B, 39 (97): 67-77.
- . 1983. Antifungal products from algal origin (review). *Rev. Int. D' Oceanogr. Med.* 72: 45-53.
- . 1987. Recursos marinos: Algas, fuente potencial de nuevos fármacos. 1. Terpenoides y metabolitos relativos. Ins. Antártico Arg. 18, Direc. Nac. del Inst. Antártico Arg., 131 pp.
- ALLARD, B. & A. TAZI. 1993. Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two *Chlamydomonas* species. *Phytochemistry* 32 (1): 41-47.
- ARCHIBALD, P. A. & H. C. BOLD. 1970. Phycological Studies XI. The genus *Chlorococcum* Meneghini. Univ. Texas Publ. (7015). Austin, Texas, 115 pp.
- BOROWITZKA, M. A. 1988. Vitamins and fine chemicals from microalgae. In M. A. Borowitzka & L. J. Borowitzka (eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge: 153-196.
- FOGG, G. E. 1971. Extracellular products of algae in fresh water. *Arch. Hydrobiol.* 5: 1-25.
- HELLEBUST, J. A. 1974. Extracellular products. In W. D.

- Stewart (ed), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London: 838-863.
- HENRIQUES VIEIRA, A. A. & S. MYKLESTAD. 1986. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). *J. Plankton Res.* 8 (5): 985-994.
- JORGENSEN, E. G. 1960. Effect of cell extracts of algae on the growth of *Bacillus subtilis*. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 59: 349.
- JUAREZ, A. B. & C. G. VELEZ. 1993. Sobre la presencia de *Chlorella kessleri* (Chlorococcales, Chlorophyceae) en aguas del Complejo Termal Copahue (prov. del Neuquén, Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 29 (1-2): 105-107.
- MYERS, J. 1962. Laboratory cultures. In R. A. Lewin (ed), *Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press, New York and London: 603-615.
- PESANDO, D. & M. GNASSIA-BARELLI. 1979. Antifungal properties of some marine planktonic algae. In H. A. Hoppe, T. Levring & J. Tanaka (eds.), *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Berlin: 461-472.
- REICHELT, J. L. & M. A. BOROWITZKA. 1984. Antimicrobial activity from marine algae: results of a large-scale screening programme. *Hydrobiologia* 116/117: 158-168.
- RICE, E. L. 1984. Allelopathy. *Academic Press*, London, 422 pp.
- SMITH, I. 1963. *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. Vol. 1. Chromatography. W. Heineman, London and Interscience Public, New York, 617 pp.
- STAHL, E. 1965. *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*, Springer-Verlag, Berlin, 553 pp.
- STAHL, E. & P. J. SCHORN. 1965. Hydrophilic constituents of plants. In E. Stahl (ed), *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag, Berlin: 371-391.
- STRYCEK, T., J. ACREMAN, A. KERRY, G. G. LEPPARD, M. V. NERMUT & D. J. KUSHNER. 1992. Extracellular fibril production by freshwater algae and cyanobacteria. *Microb. Ecol.* 23: 53-74.
- UBOGUI, J., L. RODRIGUEZ LUPO, N. H. FICOSECO, M. C. KIEN, L. D. SEVINSKY & F. STENGEL. 1991. Terapéutica no convencional de la psoriasis en las Termas de Copahue (Neuquén, Argentina). *Experiencia preliminar de dos temporadas*. *Arch. Argent. Dermat.* 41: 25-39.
- WHITE, F. J. & P. W. JAMES. 1985. A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. *Br. Lichen Soc. Bull.* 57 (suppl.).