

Artículos

Chronica naturae, 3: 10-17 (2013)Dautor *et al.*

Microalgas para biodiesel: desarrollo de un método de transformación genética para *Scenedemus almeriensis*, una especie con potencial industrial.

Yasmeen Dautor, Tarik Chileh, Patricia Úbeda Mínguez, Aurora Mañas Fernández¹, Federico García-Maroto y Diego López Alonso*

Universidad de Almería, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, Grupo de investigación BIO-279 “Biotecnología de Productos Naturales”, 04071 Almería, España.

¹Dirección actual: Grupo de Bioenergía, Centro de Tecnología de REPSOL, Ctra. A-5 Km 18, 28935 Móstoles, Madrid, España.

*Autor para correspondencia: dlopez@ual.es

RESUMEN

*El progresivo agotamiento de las reservas de combustibles fósiles está promoviendo la búsqueda de fuentes alternativas renovables. El biodiesel —diésel producido a partir de los aceites vegetales, fundamentalmente— se presenta como una de las alternativas más claras. Pero cubrir las demandas de biodiesel exclusivamente a partir de las plantas cultivadas plantearía graves problemas y, según se calcula, sería insuficiente. Las microalgas se sugieren como solución necesaria, libre además de los problemas anejos a las plantas. Pero el aceite de microalgas es, actualmente, extraordinariamente caro de producir. Para abaratar esta materia prima los expertos recomiendan modificar genéticamente las microalgas prometedoras lo que sólo será posible desarrollando métodos de transformación genética. En este trabajo se describe el desarrollo de un método eficiente de transformación genética para *Scenedemus almeriensis* vía *Agrobacterium tumefaciens* y se discute su aplicabilidad más allá del biodiesel mediante el uso de *S. almeriensis* como biofactoría.*

Palabras clave: microalgas, biodiesel, transformación genética, *S. almeriensis*, *A. tumefaciens*, biofactorías.

INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles se agotarán, en un plazo más o menos largo, de ahí la imperiosa necesidad de buscar fuentes alternativas de combustible renovables. El biodiesel es una fuente **renovable** que se obtiene a partir de las grasas y aceites (incluidos los desechados después de ser utilizados para freír). También se obtiene biodiesel de aceites vegetales (colza, soja, etc.) expresamente producidos para ello. En EE.UU. ha originado un serio conflicto denominado “*foods vs. fuels*” (alimentos frente a carburantes). El uso de plantas para la producción de biocarburantes, en general, plantea un par de problemas adicionales graves: el incremento de la demanda de suelo agrícola y de agua de riego. Ambos problemas, aparte de suponer un encarecimiento de dos recursos agrícolas imprescindibles y escasos, plantean amenazas ambientales tales como la roturación de bosques, la sobreexplotación de los acuíferos, etc.

Artículos

Y, en cualquier caso, cálculos elementales demuestran tajantemente, que es imposible sustituir el petrodiesel por biodiesel vegetal exclusivamente, y que sólo las microalgas pueden ser la solución (Chisti, 2007). Aunque compartimos las palabras de John Benemann (2012), un experto que opina que el campo de los biocombustibles de algas está poblado de “*promociones fantásticas, sistemas de cultivo extravagantes, y proyecciones de productividad absurdas*”, con todo rigor se puede sostener que las microalgas tienen las siguientes ventajas:

- » **Una elevada productividad de aceite.** Por ejemplo, *S. almeriensis*, es capaz de producir anualmente unos 20.000 L/ha frente a los cerca de 6.000 L/ha de la especie vegetal más productiva en aceite (la palma).
- » **Pueden ser cultivadas en cualquier tipo de terreno**, incluso en terrenos completamente inservibles para cultivos agrícolas, con lo que **no compiten por terrenos cultivables**.
- » **No demandan agua de riego**, que es un bien extremadamente escaso en muchas partes del planeta, sino que pueden crecer, muchas de ellas, en aguas no útiles para la agricultura, en aguas residuales o en agua de mar (las miles de especies marinas).
- » Finalmente, su uso **elude completamente la confrontación “foods vs. fuels”**, dado que el cultivo de microalgas sólo en muy pequeña proporción está destinado al consumo humano, en mercados marginales como el de los complementos nutricionales o “*healthfoods*”.

Por tanto, las microalgas son una fuente ideal de biodiesel y, sin embargo, —a despecho de lo afirmado en los alardes publicitarios de alguna multinacional petrolífera—, no existe aún una industria de tal tipo. ¿Por qué?. **El coste del aceite de microalgas.** Con diferencia, este es el aspecto clave de todo el asunto, ya que de lo que se trata es de producir aceite microalgal a un precio razonable de mercado. Y justamente en este aspecto clave es donde más sufre la hipótesis de producir biodiesel microalgal, porque el coste de la materia prima, el aceite de microalgas, es extraordinariamente elevado (de 20.000-90.000 \$/tn). Incluso en la estimación muy ponderada de Benemann, el coste del aceite microalgal vienen ser ~20 veces el precio del petróleo crudo actual (500 \$/tn). Y también es muy superior al coste del aceite vegetal que está en el entorno de los 1.300 \$/tn.

¿Qué hacer? El reto está claro: el coste de la biomasa microalgal tiene que ser substancialmente reducido y, al mismo tiempo, debería de incrementarse la productividad en aceite hasta el máximo posible, con el objetivo de reducir el coste de la tonelada de aceite microalgal desde los actuales 20.000\$ hasta ~1.400\$. Aparentemente el foso es insalvable... pero estamos hablando de microorganismos y creemos que es aplicable lo que ha sucedido en otros casos. Por ejemplo, la productividad de penicilina de las cepas modernas es 5.000 veces superior a la original, incremento que se ha conseguido en unos 50 años.

Hay un consenso prácticamente unánime, que considera el desarrollo de la transformación genética de microalgas como el elemento clave para convertir las microalgas en microorganismos industriales. De las más de 40.000 especies de microalgas, sólo está descrita la transformación genética de poco más de una docena y la mayoría de ellas no reúne las características deseables para un microorganismo **industrial**: capaz de crecer en cultivo masivo (en reactores industriales), robusto frente a fluctuaciones del medio (pH, salinidad, temperatura, etc.), y de crecimiento rápido (productividad). De modo que el reto es conseguir métodos de rutina para transformar genéticamente microalgas industrialmente prometedoras.

Artículos



Foto 1. *S. almeriensis* vista con un microscopio electrónico de barrido. (Imagen cedida por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería).

Scenedesmus almeriensis es una especie de alga verde (Clorofita) de agua dulce aislada por investigadores de la Universidad de Almería procedente de charcos de desecación de invernaderos. Esta especie soporta grandes fluctuaciones de temperatura, pH y salinidad. Ha sido cultivada en las instalaciones de “Las Palmerillas” (Fundación CAJAMAR) situadas en La Mojonera (Almería) en reactores de 6.000 L establemente, durante un año, con luz solar, con una elevada velocidad de crecimiento (Sánchez *et al.*, 2008). En suma, reúne todos los requisitos para poder convertirse en un microorganismo industrial. Nosotros nos propusimos desarrollar un método de transformación genética para *S. almeriensis* con el objetivo inmediato de producir biodiesel, pero pensando más allá en su posible utilidad para multitud de propósitos industriales. En el presente artículo describimos de una manera asequible para un lector sin formación especializada en este campo, cómo hemos desarrollado un procedimiento de transformación genética para esta microalga y discutimos su posible alcance.

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie utilizada ha sido *Scenedesmus almeriensis*, un alga verde de agua dulce aislada en Almería por el grupo del Dr. Molina Grima del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería.

Para cultivar la microalga en medio líquido se ha utilizado TAP (Tris-acetato-fosfato), un medio de rutina para algas verdes de agua dulce. En medio sólido se ha cultivado en un medio comercial denominado agar nutritivo a pH 8. Los cultivos se han realizado a 26° con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad.

Artículos

La transformación genética se ha llevado a cabo mediante *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, una bacteria especializada en infectar células vegetales. El vector de transformación utilizado ha sido el plásmido pCAMBIA 1305.1 que lleva un gen de selección que confiere resistencia a higromicina además del gen *GUS* como reportero, en el segmento de DNA que es transferido a la microalga (el denominado T-DNA; Figura 1).

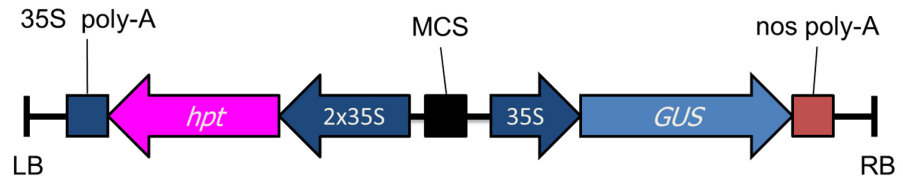
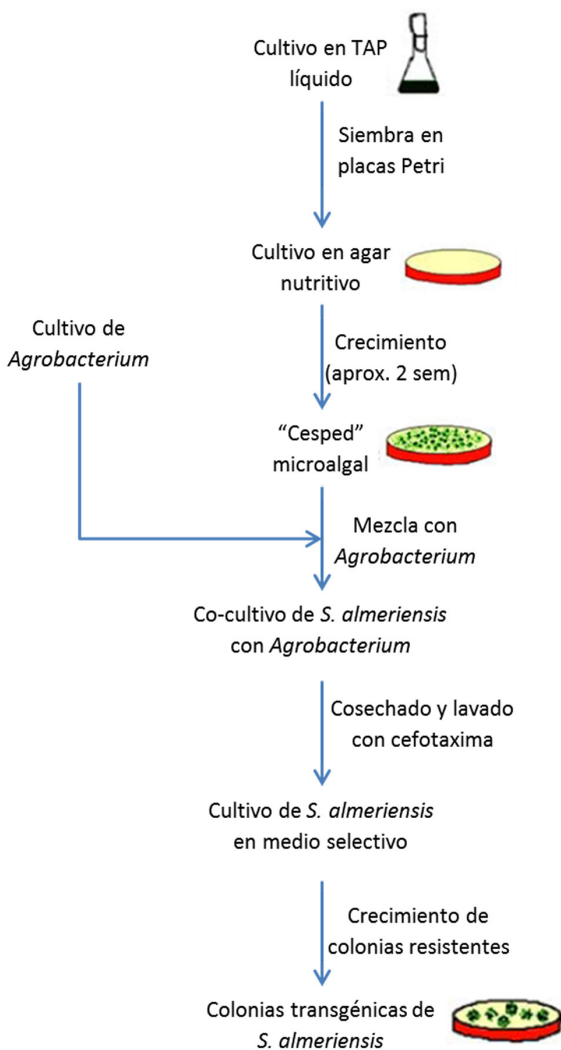


Figura 1. Organización del T-DNA del vector pCAMBIA 1305.1. Se representan los dos genes que contiene, *hpt* y *GUS*, flanqueados cada uno de ellos por sus respectivos promotores (35S) y señales de terminación (poly-A); en medio queda el sitio de clonación múltiple (MCS) y en los extremos los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) que delimitan el T-DNA.



La determinación de las concentraciones óptimas de antibióticos para el método de transformación genética se hizo mediante un experimento factorial de 6x4 en el que se ensayaron las siguientes concentraciones: higromicina 0,10, 20, 30, 40 y 50 mg/L; cefotaxima 0, 250, 500, y 750 mg/L.

El proceso de transformación genética descrito someramente ha consistido en lo siguiente (Figura 2): utilizando un cultivo joven (en fase exponencial) de *S. almeriensis* se siembran una serie de placas y se cultivan hasta que se forma una especie de césped de microalgas. Aparte, con la antelación suficiente, se cultiva el *A. tumefaciens* para tenerlo listo en el momento en que sea necesario. Una vez que el césped verde de microalgas es bien patente, a cada placa de éstas se le añade una cierta cantidad del cultivo de *A. tumefaciens* y se mezcla todo bien, a fin de propiciar el contacto entre las células de *S. almeriensis* y las de *A. tumefaciens*. Se dejan de este modo en co-cultivo durante cierto periodo de tiempo. Transcurrido este periodo, se cosechan las células con medio líquido TAP conteniendo cefotaxima. (La cefotaxima es un antibiótico que mata a *Agrobacterium* pero no afecta a *Scenedesmus*.) Finalmente, sembramos las células cosechadas en placas con medio selectivo (conteniendo higromicina) y las dejamos crecer hasta que se ven a simple vista colonias verdes (Figura 2). En este esquema básico operamos con las siguientes variables: acetosiringona, luz, duración del co-cultivo, temperatura de co-cultivo y pH del co-cultivo.

Para determinar la presencia del gen *GUS* hicimos ampliación de un fragmento del gen mediante PCR con dos cebadores (“primers”) específicos para dicho fragmento.

Figura 2. Esquema del proceso de transformación genética.

Básicamente, la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* consiste en que desde esta bacteria se transfiere un segmento específico de DNA (el T-DNA), con los genes que contiene (Figura 1), el cual se inserta aleatoriamente en un cromosoma de la microalga. De este modo, las células transformadas tienen entre su repertorio de genes, unos genes adicionales no presentes en las células no-transformadas. En nuestro caso, la transformación supone disponer de dos genes adicionales, *hpt* (=Hyg^R, resistencia a higromicina) y *GUS* (que codifica una proteína enzimática que puede dar una reacción coloreada) (Figura 1).

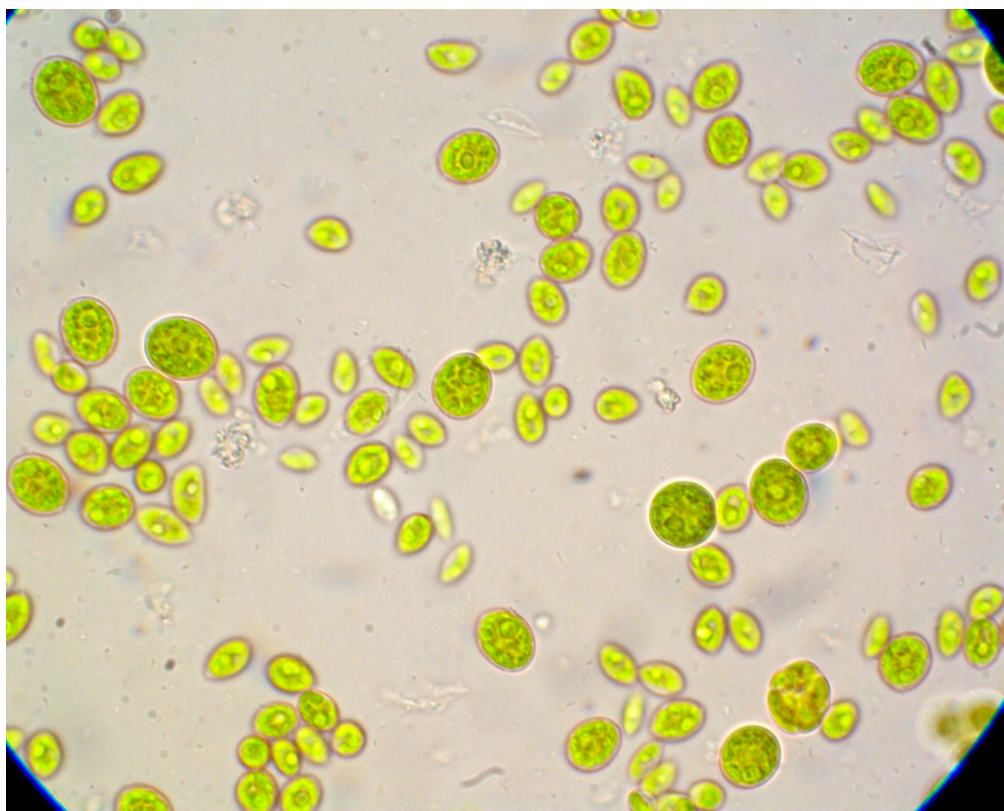


Foto 2. *S. almeriensis* vista con un microscopio óptico.
(Imagen cedida por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería).

Después de co-cultivar las microalgas con el *A. tumefaciens*, como hemos descrito antes, lo que obtenemos es una suspensión celular (Figura 2). Esta población celular es genéticamente heterogénea, es decir, está constituida por células transformadas genéticamente (que tienen insertado en su material genético el T-DNA y, por consiguiente, los genes *Hyg^R* y *GUS*) y células no-transformadas (en las que no se ha insertado el T-DNA). Aquellas son resistentes al antibiótico higromicina en tanto que éstas son sensibles a dicho antibiótico. Por consiguiente, el procedimiento para seleccionar sólo las microalgas genéticamente modificadas consiste, simplemente, en sembrar las células sometidas al proceso de transformación en placas con medio de cultivo sólido conteniendo el antibiótico (Figura 2). De este modo sencillo, tras cultivar durante un par de semanas aproximadamente, las colonias (clones) que surgen en el medio deberían de proceder de células genéticamente transformadas pues, las no-transformadas son incapaces de crecer en dicho medio.

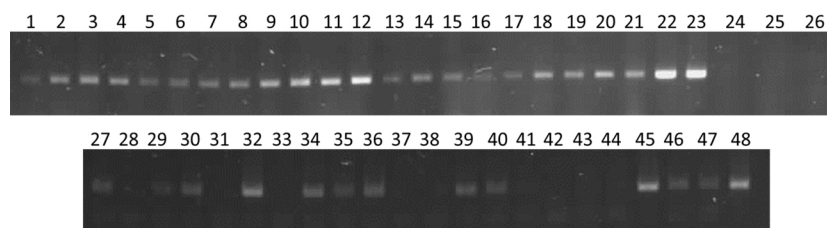
Artículos

Con respecto a los resultados de la transformación genética, hubo importantes diferencias en el número de colonias transgénicas (resistentes a higromicina) producidas por las diferentes combinaciones de los factores operacionales. En cualquier caso, la temperatura fue el único factor con un efecto estadísticamente significativo. Otros factores de operación, por ejemplo, el tiempo de co-cultivo, parecían ser importantes aunque sin alcanzar la significación estadística. En tanto que la luz, un tanto sorprendentemente, no afectaba en modo alguno durante la etapa de co-cultivo.

Globalmente cerca de 1.000 colonias transgénicas putativas crecieron en las placas selectivas. Decimos putativas porque sólo podemos asumir de modo provisional que son verdaderamente transgénicas, ya que, como se sabe, siempre se producen “escapes”, esto es, colonias de células no-transformadas que, por razones desconocidas, crecen, aun en presencia de antibiótico, pese a no llevar el gen de resistencia. Por lo tanto, siguiendo los procedimientos usuales, verificamos mediante ensayos adicionales que el proceso de transformación genética era genuino.

Para ello, cogimos una muestra de 36 colonias resistentes a higromicina y, mediante PCR, analizamos la presencia del gen *GUS* en ellas. Alrededor del 70% dieron resultado positivo (Figura 3), es decir, estaba presente el gen *GUS*. Esto indicaba que tenían los dos genes presentes en el T-DNA: *hpt* (porque eran resistentes a higromicina) y *GUS* (porque mostraban el fragmento de amplificación por PCR) y, por consiguiente, eran transgénicas auténticas.

Figura 3. PCR de colonias para *GUS*. Las líneas 1-21 y 27-48 eran de transformadas putativas; las líneas 22-23 eran controles positivos (*A. tumefaciens* portando el vector pCAMBIA1305.1); y las líneas 24-26 eran controles negativos (“wild type”).



Extrapolando los resultados podemos concluir que, groseramente, obtuvimos alrededor de 700 clones transgénicos de *S. almeriensis* en una sola ronda de transformación genética. Por lo tanto, hemos desarrollado un procedimiento de transformación genética eficiente para la microalga *S. almeriensis*.

El desarrollo de un método de transformación genética para *S. almeriensis* nos permitirá avanzar en la consecución del objetivo de aumentar el contenido en aceite de la microalga para hacerla útil como materia prima para biodiesel. Esto pensamos conseguirlo introduciendo en la microalga genes que incrementen la síntesis de aceite, en concreto, genes del tipo DGAT1. Aunque, como en toda investigación, hay un cierto nivel de incertidumbre. A favor de nuestra idea está que los genes de la denominada familia DGAT1 han incrementado efectivamente el contenido en aceite en plantas superiores (Liu *et al.*, 2012). En contra, que los pocos intentos llevados a cabo mediante transformación genética de microalgas con otros genes (DGAT2 y ACC), han fracasado en el objetivo de incrementar el aceite (La Russa *et al.*, 2012; Dunahay *et al.* 1996).

No obstante, en nuestra opinión, es el desarrollo de un método de transformación genética para *S. almeriensis*, en sí mismo, el que puede llegar a tener una importancia capital en la biotecnología de microalgas. Se puede objetar que hay una decena de especies de microalgas para las que se han desarrollado ya métodos de transformación genética. Pero ninguna de ellas tiene cualidades como microorganismo industrial.

Artículos

Hablamos de adaptación a cultivo en masa, robustez de los cultivos y velocidad de crecimiento, cualidades demostradas por *S. almeriensis*. Para entender mejor lo que queremos decir baste un ejemplo: *S. almeriensis*, con un 12% de contenido en aceite, ocupa la cola de las microalgas oleaginosas; en cambio, si comparamos productividad, se sitúa en el primer lugar (Tabla 1). En suma, lo que queremos enfatizar es que hemos desarrollado un método de transformación genética para una microalga con potencial industrial, no para una especie modelo de laboratorio. Adicionalmente, la técnica puede ser utilizada para introducir en la microalga cualquier gen que interese, (por ejemplo, un gen para producir un fármaco), con lo que se abre un abanico de posibilidades virtualmente infinitas utilizando *S. almeriensis* como biofactoría de productos de alto valor.

Tabla 1. Comparación entre el contenido total en lípidos y la productividad en lípidos (expresada en miligramos por litro y por día).

ESPECIE	LÍPIDOS TOTALES (% PESO SECO)	PRODUCTIVIDAD (mg/L-d)
<i>Scenedesmus almeriensis</i> *	12	144
<i>Chlamydomonas BAFJ5</i> **	46	95
<i>Chlorella emersonii</i> **	63	50
<i>Chlorella vulgaris</i> **	38	54
<i>Chlorococcum</i> sp. **	32	109
<i>Nannochloris</i> sp. **	30	77
<i>Nannochloropsis</i> sp. **	34	76
<i>Neochloris oleoabundans</i> **	34	133
<i>Pavlova lutheri</i> **	36	50
<i>Pavlova salina</i> **	31	49

*Sánchez *et al.* (2008)

**Liu *et al.* (2010)

CONCLUSIONES

Se ha conseguido desarrollar un método de transformación genética para *Scenedesmus almeriensis* vía *Agrobacterium tumefaciens*. El método es relativamente sencillo y muy eficiente pues genera cientos de clones transgénicos en un único experimento. No obstante, tiene que tenerse en cuenta que hay una proporción substancial de “escapes”, estimada groseramente como de un 30%, que obliga a efectuar un proceso de verificación de los clones para determinar los que son verdaderamente transgénicos. El método de transformación genética para *S. almeriensis* será aplicado a la producción de biodiesel mediante la introducción de genes que incrementan la síntesis de aceite. Más allá de este objetivo inmediato, la técnica desarrollada puede ser aplicada a la producción de cualquier proteína recombinante en la microalga *S. almeriensis* usándola como biofactoría.

AGRADECIMIENTOS

Las actividades de investigación desarrolladas son financiadas por el proyecto de excelencia de Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, P10-CVI-05869, y por el proyecto de la convocatoria INNPACTO del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, IPT-2011-0842-920000.

BIBLIOGRAFÍA

- CHISTI, Y., 2007. Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.
- BENEMANN, J.R., 2012. *Microalgae biofuels and animal feeds: An introduction*, personal communication.
- SÁNCHEZ, J.F., FERNÁNDEZ, J.M., ACIÉN, F.G., RUEDA, A., . PÉREZ-PARRA, J, . MOLINA, E., 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis.*, *Process Biochem.* 43: 398-405.
- LIU, Q., SILOTO, R.M., LEHNER, R., STONE, S.J., WESELAKE, R.J., 2012. Acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Prog. Lipid Res.* 51: 350-377.
- LA RUSSA, M., BOGEN, C., UHMEYER, A., DOEBBE, A., FILIPPONE, E., KRUSE, O., MUSSGNUG, J.H., 2012. Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii.*, *J. Biotechnol.* 162: 13-20.
- DUNAHAY, T.G., JARVIS, E.E., DAIS, S.S., ROESSLER, P.G., 1996. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57/58: 223-231.

