

Purificación de cultivos mediante separación de células con citometría de flujo

Sil-lá Abad, Isabel Rodríguez Carvajal y Javier Gilabert

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental,

Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT),

Alfonso XIII, 44 30203-Cartagena.

sil_la.abad@upct.es;

Resumen

Dos especies de dinoflageladas (*Amphidinium carterae* y un dinoflagelado desnudo de pequeño tamaño) fueron aislados del puerto de Cartagena mediante técnicas clásicas de separación en placa y dilución. Los cultivos se purificaron posteriormente mediante “sorter” con citometría de flujo y se mantuvieron viables. Aquí describimos el protocolo seguido, las dificultades encontradas en el proceso y las soluciones encontradas.

Introducción

El mantenimiento de las colecciones de cultivo es una tarea fundamental en cualquier laboratorio de fitoplancton tóxico. El aislamiento y purificación de cultivos requiere precisión y tiempo. La citometría de flujo es una técnica que puede ayudar en estas tareas. Los separadores de células (*sorters*) permiten la adquisición de un elevado número de células de las mismas características por unidad de tiempo. El citómetro permite definir las características de las células al menos con cinco parámetros, normalmente tres de fluorescencia y dos de dispersión de la luz, en función del equipamiento del instrumento. Los citogramas – gráficos que enfrentan dos o tres de los parámetros medidos por el citómetro- de muestras naturales permiten distinguir nubes de puntos correspondientes a células con características citométricas relativamente homogéneas. Suelen mostrar clusters de células bien diferenciados cuando las características citométricas son diferentes y muy solapados cuando las características son homogéneas. Aunque la citometría no es una técnica taxonómica *per se* puede de gran utilidad para diferenciar organismos una vez separados e identificados. En nuestro caso hemos trabajado sobre dos cultivos en diferentes estados de conservación y contaminación por otras células para purificar el cultivo mediante la separación automática de las células cultivadas.

Los cultivos aislados con el método de diluciones seriadas en microplacas y posteriormente escalados a tubos de ensayo y matraces a menudo no quedan completamente separados, quedando algunos ejemplares de otras especies que en ocasiones proliferan y compiten con la cepa de interés. Para realizar estudios posteriores se requieren monocultivos de una sola cepa. También ocurre que en ocasiones los cultivos se estropean por exudados celulares y por células muertas quedando un cultivo sucio, aunque no contaminado por otras células. Habitualmente la limpieza de estos cultivos se hace mediante diluciones pero hay ocasiones en que los cultivos quedan excesivamente estropeados y la técnica de diluciones resulta

costosa, lenta y no siempre con garantía de éxito. La citometría de flujo es la técnica adecuada para este tipo de trabajo en que se quiere separar las células sanas de las otras muertas o del detritus originado por el propio cultivo. En caso de contaminación por otro tipo de células, sobre todo cuando éstas son de tamaño mucho menor, la citometría es la técnica más precisa para ello.

Material y métodos

Del puerto de Cartagena se aislaron dos cepas, la primera de *Amphidinium* sp y la segunda de un dinoflagelado pequeño y desnudo probablemente del género *Karenia*. Los cultivos se aislaron mediante técnicas convencionales de aislamiento con micropipeta, diluciones seriadas y cultivo en placa de pocillos para su posterior escalado a matraces (250 mL) con medio L. Los cultivos se dejaron contaminar en laboratorio para intentar su posterior purificación mediante separación con citómetro de flujo (FACScalibur de Becton-Dickinson) equipado con un *sorter* mecánico de alta velocidad. Los parámetros utilizados por el citómetro fueron la fluorescencia verde (FL1), naranja (FL2) y roja (FL3) y la dispersión de la luz hacia delante (FSC) y lateral (SSC).

En primer lugar se procedió al lavado de los contenedores y los conductos por donde circula el fluido envolvente "*sheath fluid*". Para ello se lavaron con etanol 70% según el protocolo establecido pro Beckton-Dickinson para el tratamiento de muestras estériles. El contenedor de fluido envolvente fue limpiado 3 veces agitando fuertemente para el lavado de las paredes y posteriormente rellenado (3 L) con etanol 70%. Los tubos de recogida de muestras a la salida del *sorter* fueron también esterilizados con etanol. En el dispositivo de toma de muestras del citómetro se introdujo un tubo también relleno de etanol 70%. En nuestro caso el citómetro dispone de 3 tubos de ensayo de recogida de las células separadas por el *sorter*. El citómetro estuvo en funcionamiento con etanol 70% y con el *sorter* activado hasta el llenado total de los 3 tubos de recogida de muestras. Con ellos se aseguraba que todo el circuito interno quedaba completamente estéril.

Una vez acabada la limpieza del citómetro se procedió a sustituir el depósito de líquido envolvente por otro previamente esterilizado con etanol 70% y conteniendo el medio de cultivo L. Para evitar las impurezas y cristales que suelen quedar en el medio tras su autoclavado éste se filtró dos veces por filtro de fibra de vidrio GF/F (con soporte Millipore cat. N° XX4304700) en un sistema impulsado por bomba peristáltica y en campana de flujo laminar. Todos los tubos y soportes para filtros fueron previamente esterilizados. El tubo de toma de muestra del citómetro fue sustituido por otro conteniendo el medio de cultivo doblemente filtrado. Se repitió el procedimiento de limpieza del citómetro para asegurar que no quedara ningún resto de etanol en los circuitos internos del sistema incluidos los que van a los tubos donde se recogen las muestras separadas. Tras este procedimiento se procedió a colocar los tubos de muestra con los cultivos contaminados para su purificación.

Resultados y discusión

La Fig. 1 muestran algunos ejemplares de las especies aisladas de *Amphidinium* en cultivos envejecidos.

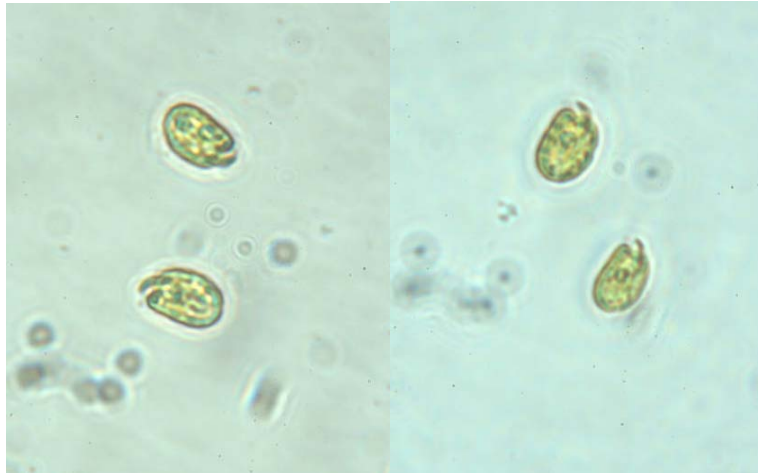


Figura 1. Ejemplares de *Amphidinium* en cultivos envejecidos antes de la purificación con citometría de flujo.

Los resultados obtenidos por el citómetro de flujo para *Amphidinium* se muestran en la Fig. 2 donde se incluyen los histogramas para cada uno de los parámetros medidos y los citogramas de dispersión lateral de la luz (SSC) frente a la dispersión hacia delante (FSC). En este caso se aprecia una población bien definida aunque con cierta heterogeneidad lo que se debe a diferencias morfológicas de las células pero también a otros componentes detríticos o de otro tipo de células. En el citograma se delimitó una región de separación de células (marcada en rojo) y se aislaron cantidades relativamente elevadas con el fin de mejorar la viabilidad de los cultivos posteriores. El resultado fue satisfactorio obteniéndose tres tubos de ensayo con densidades del orden de $60.000 \text{ cel mL}^{-1}$ cada uno.

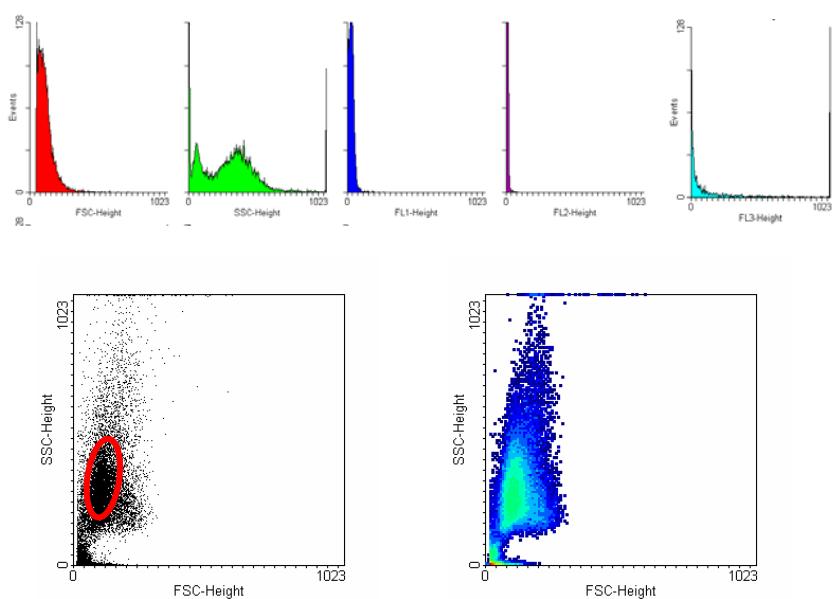


Figura 2. Citogramas para *Amphidinium*. En la parte superior se muestran los histogramas para FSC, SSC, FL1, FL2 y FL3. En la parte inferior se representan los gráficos de dispersión de puntos de SSC frente a FSC. En el gráfico de la izquierda se ha marcado la ventana de separación de células para el *sorter*, en el de la derecha se muestra el mismo gráfico con más eventos con los colores indicando la densidad de eventos.

La Fig. 3 muestran algunos ejemplares de *Amphidinium* procedentes de cultivos crecidos a partir de células “*sorteadas*” mediante el citómetro de flujo.

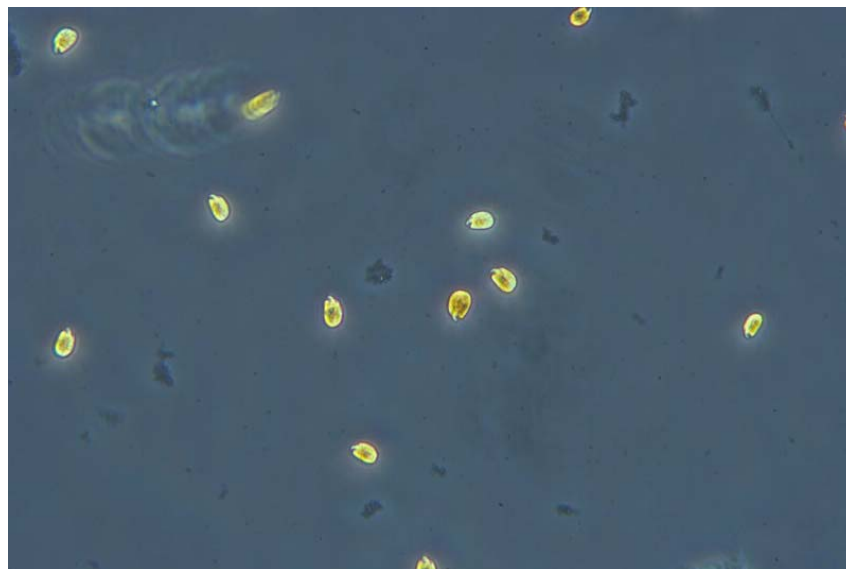


Figura 3. Ejemplares de *Amphidinium* procedentes de cultivos crecidos a partir de células separadas mediante el citómetro de flujo.

Las células del tipo *Karenia*, a diferencia de las de *Amphidinium*, son de menor tamaño y más homogéneas en cuanto a forma y tamaño por lo que cabe esperar que en los citogramas basados en SSC y FSC aparezcan poblaciones bien definidas.

La Fig. 4 muestra algunas células de este pequeño dinoflagelado desnudo que hemos asignado tentativamente al género *Karenia* en cultivos estropeados y contaminados.

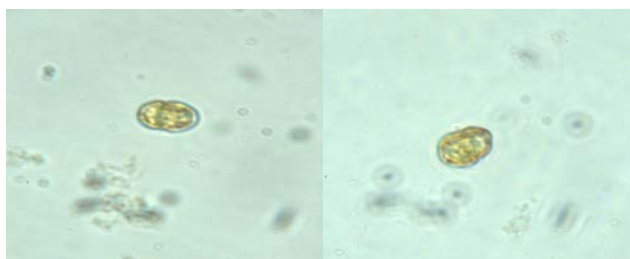


Figura 4. Ejemplares de *Karenia* en cultivos envejecidos y contaminados antes de la purificación con citometría de flujo.

La Fig. 5 muestra los citogramas para este cultivo. Los gráficos de dispersión SSC frente a FSC muestran claramente tres grupos de puntos bien diferenciados, dos de ellos correspondientes a dos poblaciones de especies diferentes. En efecto, los cultivos se habían contaminado con una especie no identificada de pequeñas esferas mostradas en la Fig. 6. En el gráfico inferior izquierdo se ha marcado la ventana de las condiciones para la separación de células del tipo *Karenia*.

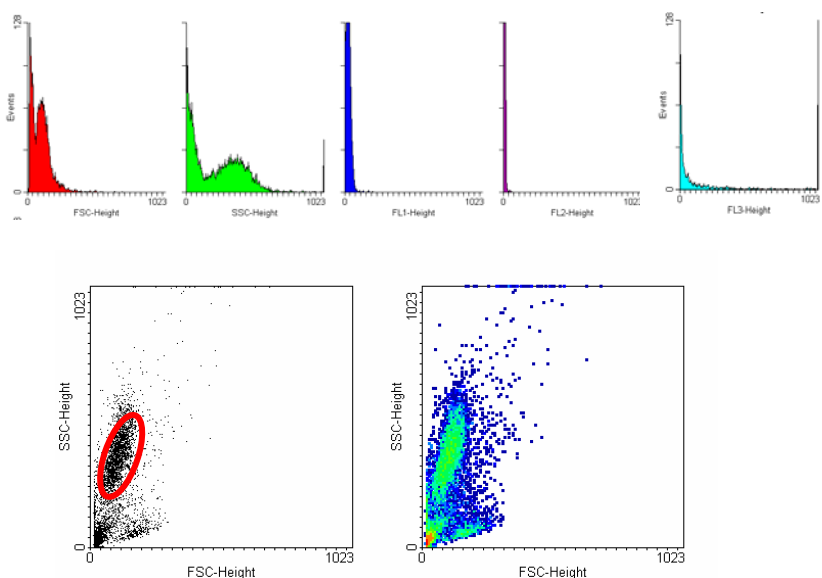


Figura 5. Citogramas para *Karenia*. En la parte superior se muestran los histogramas para FSC, SSC, FL1, FL2 y FL3. En la parte inferior se representan los gráficos de dispersión de puntos de SSC frente a FSC. En el gráfico de la izquierda se ha marcado la ventana de separación de células para el sorter, en el de la derecha se muestra el mismo gráfico con más eventos con los colores indicando la densidad de eventos.

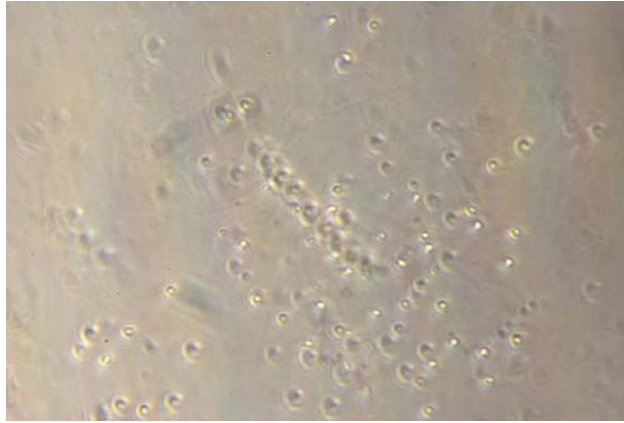


Figura 6. Microorganismos contaminantes encontrados en los cultivos de *Karenia*.

La Fig. 7 muestran algunos ejemplares de *Karenia* procedentes de cultivos crecidos a partir de células separadas por el citómetro.

Como se puede apreciar las células mantienen una morfología definida, se observa la estructura interna que denota el buen estado de los organismos.

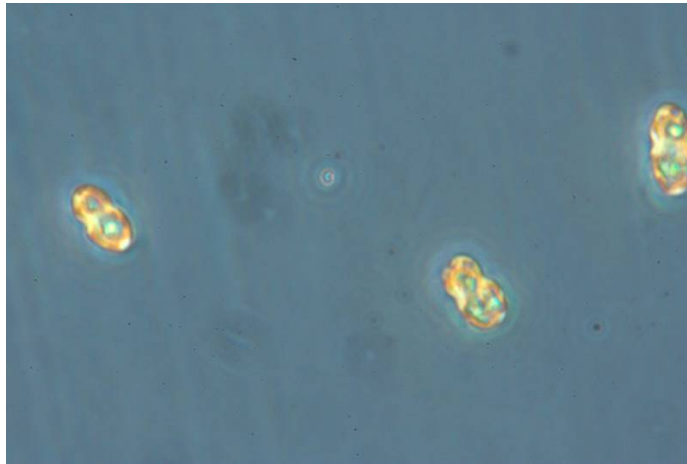


Figura 7. Ejemplares de células del tipo *Karenia* procedentes de cultivados crecidos a partir de células “*sorteadas*” mediante el citómetro de flujo.

Conclusión

Los resultados obtenidos para estas dos especies sugieren que el uso de la citometría de flujo puede ser de gran utilidad para la purificación de cultivos. Aunque resulta difícil utilizarla como herramienta primaria de aislamiento de especies, excepto en casos muy concretos, se presenta como una herramienta fiable y rápida para la purificación de cultivos envejecidos o contaminados.