

Producción de cianobacterias extremófilas como estrategia para la reversión de suelos desertificados

Tesista: Ing. María Fernanda Lencina

Directora: Dra. Carolina Belfiore

Co-directora: Ing. Nora Perotti

PROIMI
BIOTECNOLOGIA



CONICET



LIMLA

Biocrust



- ▶ La corteza biológica del suelo (biocorteza o biocrust) es una capa formada por la unión de componentes biológicos, como cianobacterias, y partículas minerales.
- ▶ la biocorteza se asemeja a una "alfombra" y actúa como una capa orgánica que le confiere, a la superficie, resistencia a la erosión eólica (Li y col., 2014).
- ▶ Funciones: aumentar el contenido de agua del suelo y su fertilidad, reduce el contenido de metales y mejorar las condiciones de pH y conductividad del suelo superficial y aumentar efectivamente la biomasa microbiana y la actividad enzimática de la matriz superficial del suelo, promover el desarrollo del suelo, acelerar la germinación de semillas y la restauración de la vegetación (Zhang y col., 2016, Lan y col., 2013, Rossi y col., 2017)

Cianobacterias

Son bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica.

Las cepas con las que contamos en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas (LIMLA-PROIMI-CONICET), son el primer hallazgo de cianobacterias a tal altitud (>3500 msnm) sometidas a alta radiación ultravioleta, baja presión de oxígeno en la atmósfera, grandes cambios de temperatura, bajo nivel de disponibilidad de nutrientes, altas concentraciones de metales pesados y un ambiente volcánico.

Cepa	Nombre científico	Origen
GTAR-001	Anabaena sp.	Laguna Socompa, Salta
GTAR-003	Symplocastrum sp.	Laguna Socompa, Salta
GTAR-004	Leptolyngbya sp.	Laguna Socompa, Salta
GTAR-015	Leptolyngbya thermalis	Laguna Diamante, Catamarca
GTAR-017	Anabaena sp.	Laguna Santa María, Salta
GTAR-027	Synechocystis sp.	Laguna Socompa, Salta
GTAR-028	Chroococcus sp.	Laguna Socompa, Salta
GTAR-044	Leptolyngbya sp.	Laguna Diamante, Catamarca



► Objetivo general

Producir cianobacterias extremófilas que permitan obtener una biocorteza artificial compuesta por el complejo arcilla-cianobacterias para reparar suelos desertificados en áreas áridas y semiáridas.

► Objetivos específicos

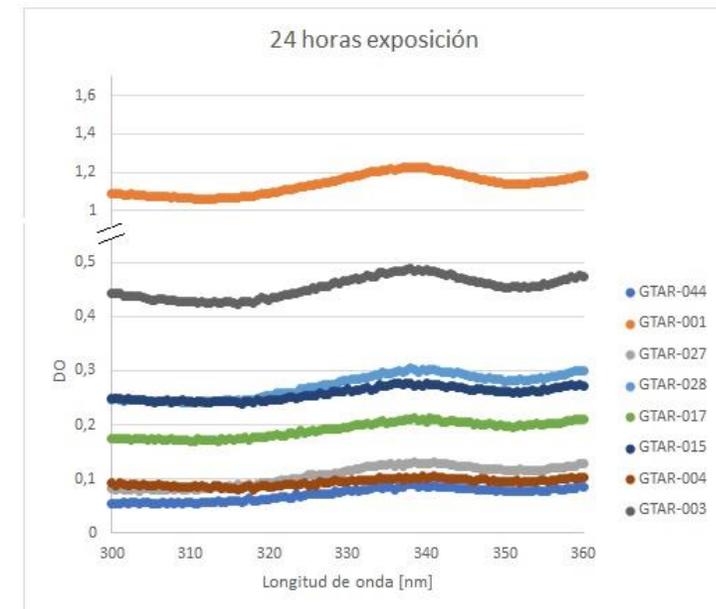
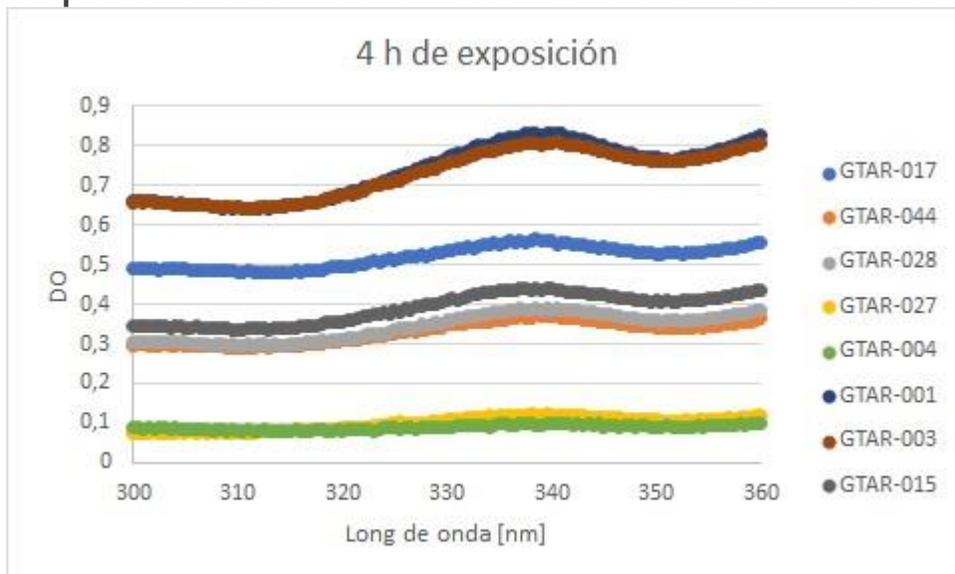
- 1) Evaluar la habilidad de diferentes cianobacterias del cepario del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas (LIMLA) -PROIMI- CONICET de generar aminoácidos tipo micosporina (MMAs) como agentes protectores contra la radiación UVB, de remover metales pesados y de producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).
- 2) Determinar el efecto de diferentes condiciones operativas (agitación, temperatura, pH, tiempo de cultivo, ciclos de luz-oscuridad) sobre la cinética de crecimiento de las cepas de cianobacterias seleccionadas en el objetivo anterior.
- 3) Investigar los efectos fisiológicos y bioquímicos de diferentes tipos de minerales arcillosos (montmorillonita, caolinita, clorita) sobre las cianobacterias.
- 4) Escalar el proceso de producción de biomasa en biorreactor instrumentado.
- 5) Evaluar el “*biocrust*” obtenido con estudios a escala laboratorio

Producción de aminoácidos tipo micosporina (MMAs)

- ▶ Son sustancias pequeñas (<400 Da), incoloras, solubles en agua, compuestas por ciclohexenona o cromóforos de cyclohexenimina que conjugan con el sustituyente de nitrógeno de un aminoácido o su alcohol imino. Absorben en el espectro UV entre 230 y 400 nm, con máximos que van de 310 a 360 nm. (Torres, 2015)
- ▶ Se reportaron MAAs en diversos organismos: bacterias heterotróficas, líquenes, cianobacterias, hongos, microalgas y macroalgas (Sinha y col, 2007).
- ▶ La síntesis y acumulación de MAAs permite adaptación de los microorganismos a los efectos perjudiciales de la radiación UV solar (Shick y col., 2002, Gao y col., 2011).
- ▶ Los MAAs protegen a la células mediante la absorción de la radiación UV y disipando la energía de la radiación absorbida en forma de calor sin generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Conde y col., 2007)

Producción de aminoácidos tipo micosporina (MMAs)

- ▶ Si bien la identificación y caracterización de MAAs requiere cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), Velasco-Charpentier y col. 2016 propone como estimador de la concentración de MAAs el análisis de extracto metanólico mediante espectrofotometría.
- ▶ Se expusieron las cepas en tubos de cuarzo en un cámara que contaba con 1 tubo Vilber Lourmat T-15 M, que emite UVB a 312 nm y con un tubo Reptistar T8 que emite UVA, UVB y PAR. los MAAs se extrajeron siguiendo la metodología de Velasco-Charpentier y col., 2016: 0,15 g de biomasa en 15 ml de metanol, a temperatura ambiente y en oscuridad por 24 h. Posteriormente el sobrenadante fue medido en un espectrofotómetro realizando un barrido de 250nm a 750nm.

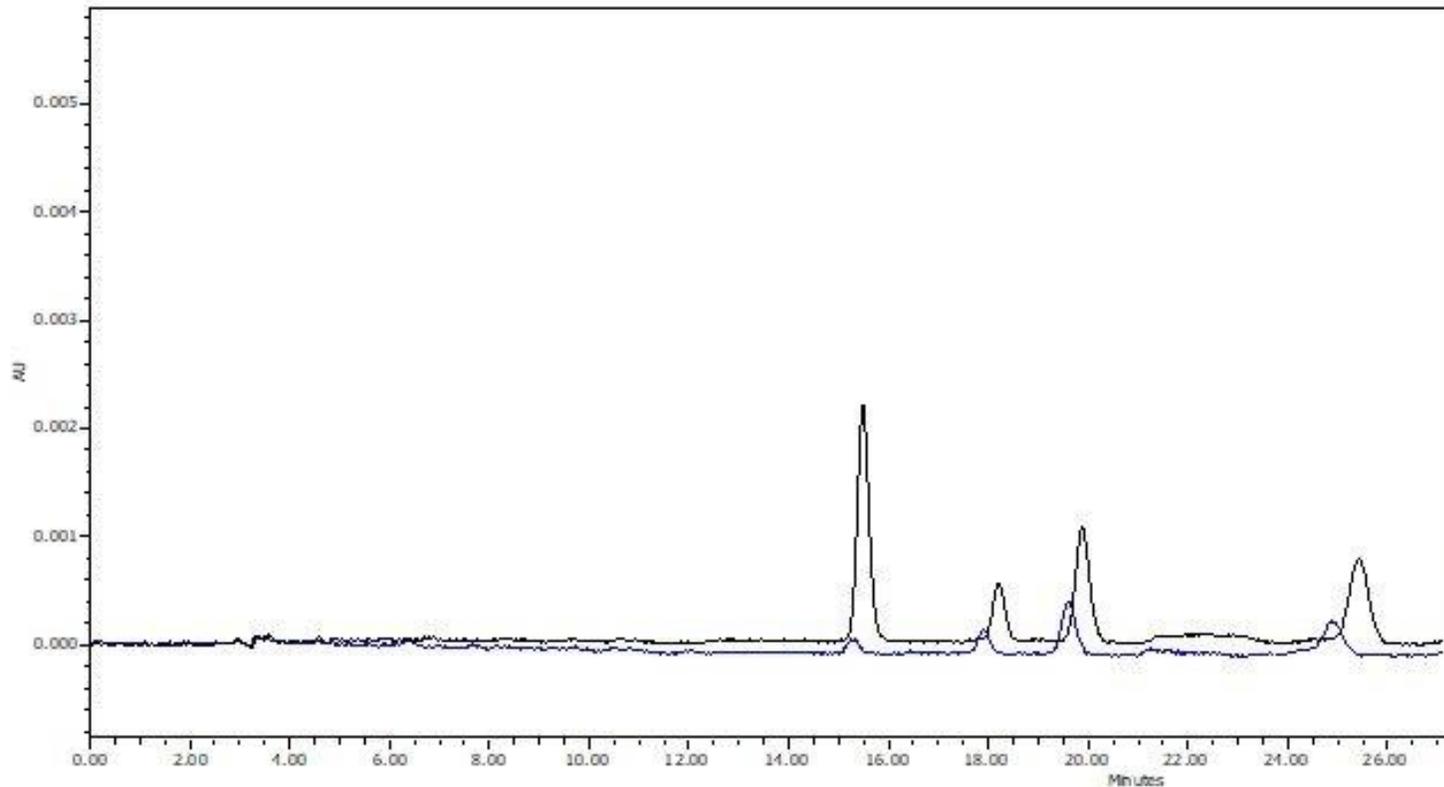


Producción de aminoácidos tipo micosporina (MMAs)

- ▶ Posteriormente se produjo la extracción de los MAAs y fueron analizados en HPLC.
- ▶ Se expone las células y se extraen de igual manera. Luego se centrifugan a 8000 rpm. Posteriormente el sobrenadante se seca overnight en Savant SpeedVac y se resuspende el sedimento en 3 ml fase móvil (H₂O, metanol HPLC 2,5% y Ac. Acético glacial 0,1%). Se filtra y se analiza en HPLC.
- ▶ Waters Alliance 2695e - detector Waters PDA 2998 - Software Empower 2 y una columna Gemini C18-5u-4.6 x 250 ms
- ▶ Se procesó la cepa GTAR-001

Producción de aminoácidos tipo micosporina (MMAs)

- Cromatogramas a 335 nm superpuestos para los diferentes tiempos de exposición UV: se puede observar un aumento en la altura de los picos con tiempo de retención aproximado en 15.5, 18, 20, 25.5, 28 a medida que aumenta el tiempo de exposición.



— 4 h exposición
— 24 h exposición

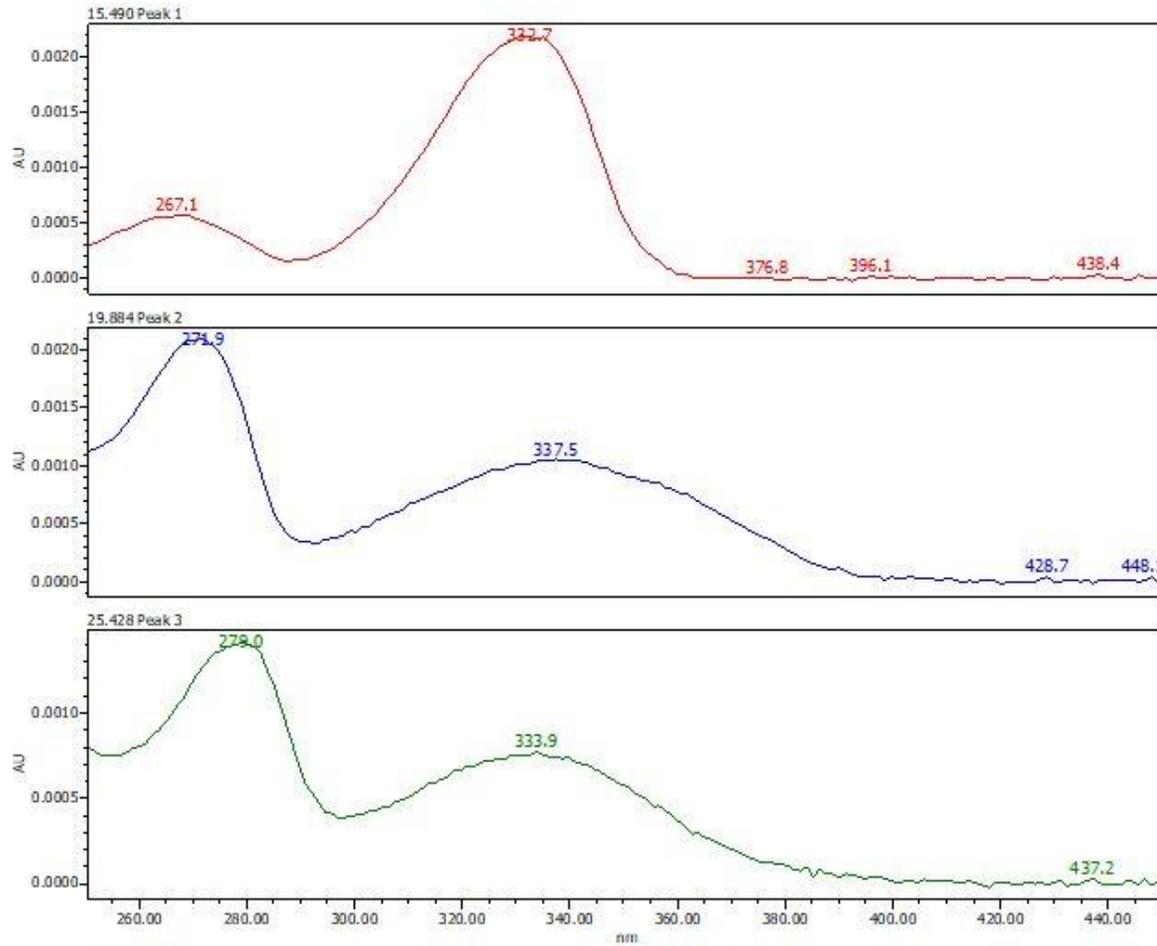
Tabla de Picos, muestra 24 h

	Retention Time	Area	% Area	Height
1	15.489	35724	27.52	2176
2	19.883	20640	15.90	1048
3	25.430	20495	15.79	756

Tabla de picos, muestra 4 h

	Retention Time	Area	% Area	Height
1	15.245	1944	3.73	132
2	19.614	9130	17.51	483
3	24.889	7666	14.70	304

Producción de aminoácidos tipo micosporina (MMAs)



Mycosporine-glutamic acid-glycine

330

Palythanol

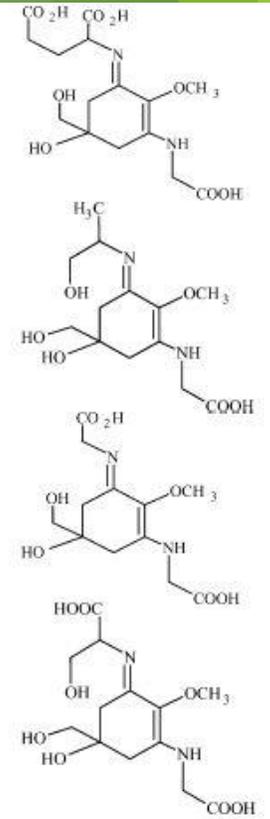
332

Mycosporine-2-glycine

334

Shinorine

334

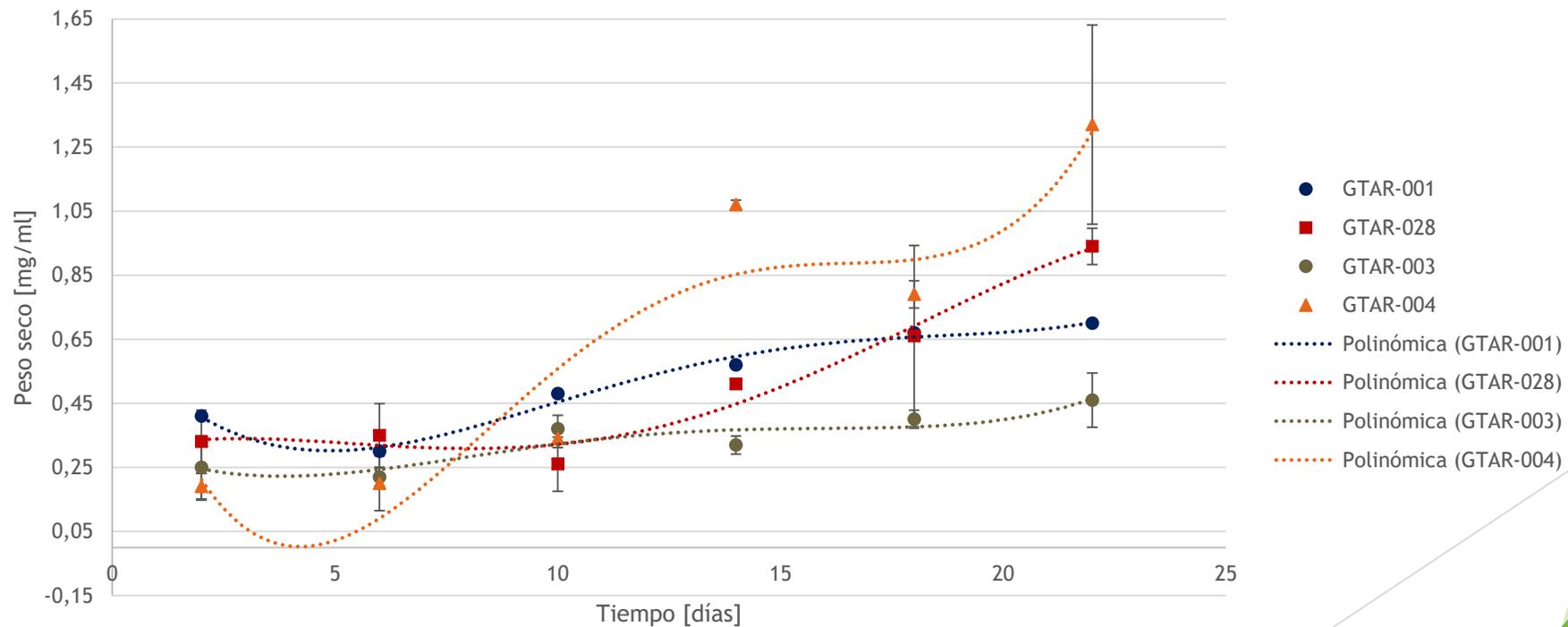


MAAs en cianobacterias- Fuente Sinha y col. 2007

Cinética de crecimiento

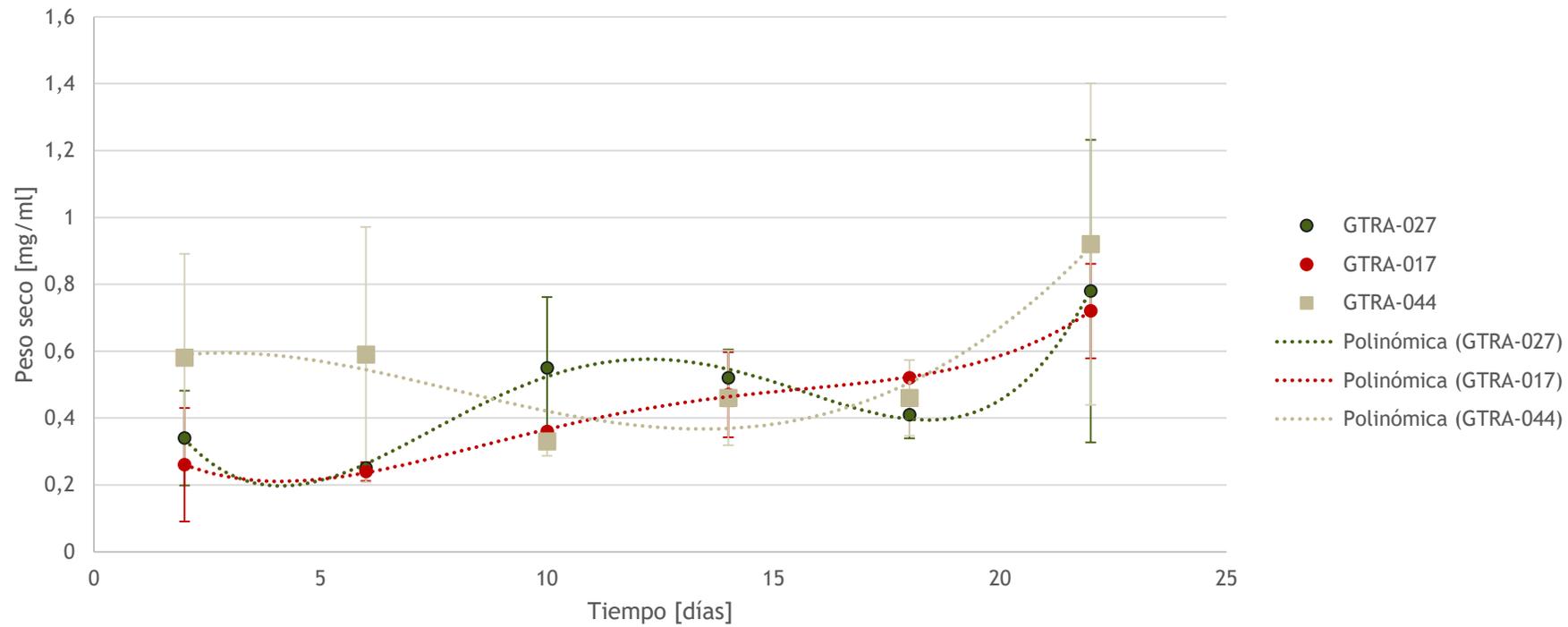
Los ensayos se realizaron por duplicados en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de volumen de trabajo en medio BG11(Rippka y col., 1979) a temperatura ambiente y con iluminación continua. Se tomaron muestras cada 4 días y la biomasa fue cuantificada usando la técnica de peso seco

Curvas de crecimiento



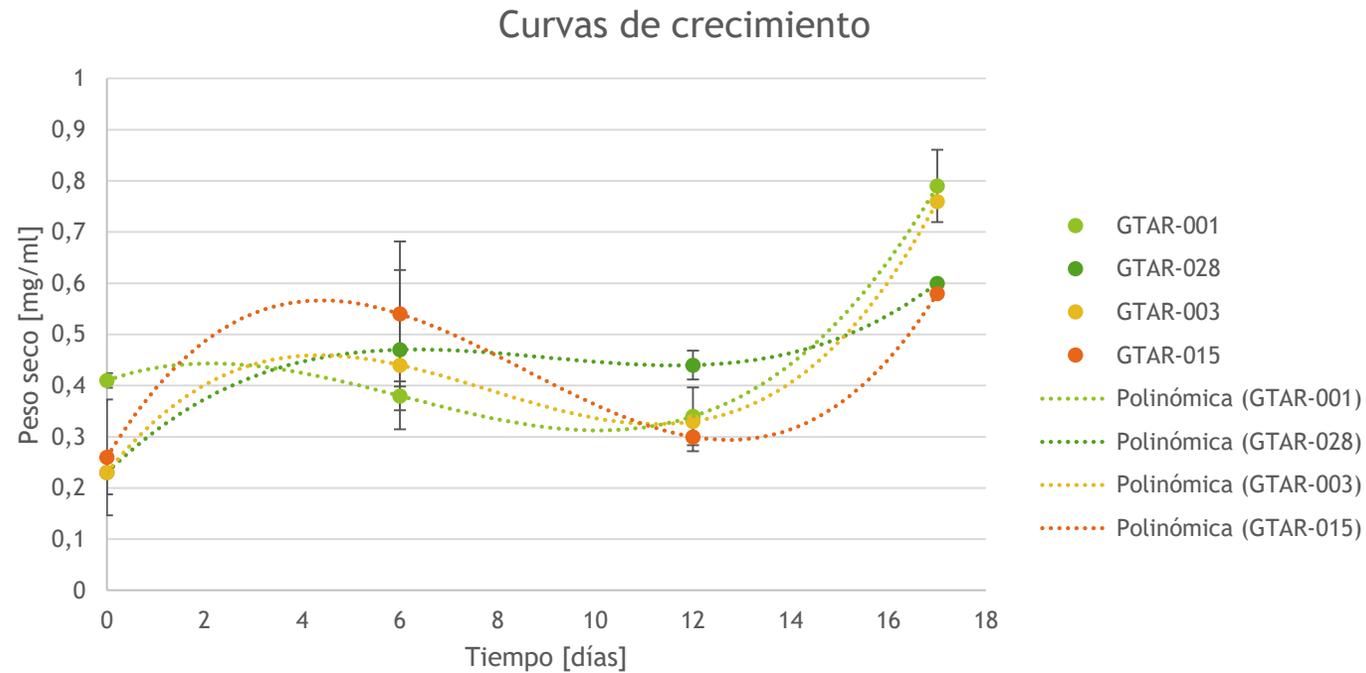
Cinética de crecimiento

Curvas de crecimiento



Cinética de crecimiento

- ▶ Los ensayos se realizaron por duplicados en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de volumen de trabajo en medio BG11 a 28°C y con fotoperiodo 12:12 en cámara Percival DR36VL. Se tomaron muestras cada 6 días y la biomasa fue cuantificada usando la técnica de peso seco



Muchas gracias

Referencias

- ▶ Li Wu, Xiaoguo Chen, Gaoke Zhang, et al. Development and Succession of Artificial Biological Soil Crusts and Water Holding Characteristics of Topsoil [D]., 2014.
- ▶ Zhang Y, Aradottir A L, Serpe M. 2016. Interactions of biological soil crusts with vascular plants[M]//Biological soil crusts: an organizing principle in drylands. Springer, Cham,: 385-406.
- ▶ Lan, S., Zhang, Q., Wu, L., Liu, Y., Zhang, D., & Hu, C. (2013). Artificially accelerating the reversal of desertification: cyanobacterial inoculation facilitates the succession of vegetation communities. *Environmental science & technology*, 48(1), 307-315.
- ▶ Rossi, F., Li, H., Liu, Y., & De Philippis, R. 2017. Cyanobacterial inoculation (cyanobacterisation): perspectives for the development of a standardized multifunctional technology for soil fertilization and desertification reversal. *Earth-Science Reviews*, 171, 28-43.
- ▶ Sinha Rajeshwar P., Singh Shailendra P., Häder Donat-P., Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 89, Issue 1, 2007, Pages 29-35, ISSN 1011-1344, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.07.006>.
- ▶ Shick JM, Dunlap WC. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective function in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 2002; 64:223-62
- ▶ Gao Q, Garcia-Pichel F. Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9:791-802
- ▶ Conde FR, Churio MS y Previtali CM. Experimental study of the excited-state properties and photostability of the mycosporine-like amino acid palythine in aqueous solution. *Photochem Photobiol Sci.* 2007; 6: 669-74
- ▶ Velasco-Charpentier C., Pizarro Mora F., Navarro N. 2016. Variación de la concentración de aminoácidos tipo mocosporina en macroalgas de las regiones de Valparaíso y Magallanes, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, Vol. 51 N° 3.
- ▶ Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. 1979. Generic assignments, strains histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111:1-61