

## Seminarios del Doctorado en Ciencias Exactas e Ingeniería 2022

**Título de Tesis:** Producción de cianobacterias extremófilas como estrategia para la reversión de suelos desertificados

**Tesista:** Ing. María Fernanda Lencina

**Director:** Dra. Carolina Belfiore

### Resumen

La construcción de “biocrust” (biocorteza, biocostra) puede proporcionar una solución viable para la restauración ecológica en sitios desertificados. La corteza biológica del suelo (biocorteza) es una capa formada por la unión de componentes biológicos, como cianobacterias, y partículas minerales

Las cianobacterias son un filo del reino bacteria que comprende bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Son los únicos procariotas que llevan a cabo ese tipo de fotosíntesis. 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, sometidos 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 (Albarracín y Farías, 2012).

La co-inoculación con arcilla y cianobacterias puede iniciar rápidamente la formación y el desarrollo de biocortezas artificiales en áreas desertificadas y promover eficazmente la restauración ecológica de hábitats extremos.

Para valorar si las cianobacterias de nuestro cepario son aptas para la formación de Biocrust primero se evaluó la capacidad que estas tienen en producir aminoácidos tipo micosporina (MAAs) al someterse a radiación UV. Los MAAs son compuestos que han recibido mucha atención por su papel en la fotoprotección de los rayos UV en las cianobacterias (Rogoff et al., 2005, Sinha et al., 2007). Para ello las 8 cepas fueron colocadas en tubos de cuarzo y expuestas a radiación UV 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. Las cepas se expusieron durante 4 h y 24 h, luego los MAAs se extrajeron siguiendo la metodología de Velasco-Charpentier et al., 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. Luego del primer análisis de estos compuestos realizados por espectrofotómetro todas las cepas demostraron capacidad de producir MAAs y las cepas GTAR-001, GTAR-003 y GTAR-015 se destacaron.

Los exopolisacáridos (EPS) tiene una estructura de cadena soluble en agua que les permite absorber varias veces su propio peso en agua (Chenu 1993) y se considera un componente importante de la retención de biocorteza. Por ello, las 8 cepas fueron evaluadas en cuanto a su capacidad de producción de EPS, las cianobacterias fueron cultivadas durante 32 días en cámara de cultivo Percival con un fotoperiodo 12:12 (12 h de luz y 12 h de oscuridad), temperatura constante de 28°C. Se utilizó el método descrito por Ahmed y col. 2014, con pequeñas modificaciones al extraer EPS de 50 ml de cada reactor. Todas las extracciones

fueron determinadas por el método de fenol sulfúrico adaptada para microplaca, midiendo absorbancia a 480 nm (Masuko y col., 2005, Dubois y col., 1956). Se determinaron 3 fracciones de EPS, EPS liberado al medio de cultivo (REPS), EPS asociado a las células (CEPS) que se extrae en dos etapas, CEPS1 y CPES2. Los resultados se expresaron como equivalentes de glucosa. Todas las cepas demostraron capacidad para producir EPS, principalmente GTAR027, GTAR017, GTEAR015.

Para que el proceso de producción de una biocorteza artificial sea aplicable y competitivo, es necesario obtener altas productividades y para ello es necesario maximizar la cantidad de células presentes por unidad de producción. En primer lugar, debe llevarse a cabo la optimización a menor escala para la producción de altos valores de biomasa, para ello se debe conocer la cinética de crecimiento de las distintas cepas de cianobacterias disponibles.

Los ensayos se realizaron en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de volumen de trabajo a temperatura ambiente y con iluminación continua. La biomasa fue cuantificada usando la técnica de peso seco, las curvas de crecimiento obtenidas son la primera aproximación a la cinética de crecimiento y nos permite conocer tiempo de duplicación, velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duración del cultivo. Las condiciones ambientales del cultivo fueron luego variadas el crecimiento de las cianobacterias, estos fueron llevados a cabo en cámaras de cultivo Percival con un fotoperiodo 12:12 (12 h de luz y 12 h de oscuridad), temperatura constante de 28°C. Los ensayos se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de volumen de trabajo y la biomasa se cuantificó por peso seco. La cepa que produjo significativamente mayor cantidad de biomasa fue la GTAR044 y las que produjeron significativamente menos biomasa fueron las GTAR017, GTAR015 y GTAR028.

Con los datos obtenidos en el screening realizado se decidió elegir a la cepa GTAR027 para continuar el trabajo de tesis y proceder al escalado de la producción de cianobacterias. Actualmente se realizan trabajos de puesta a punto del inóculo que se utilizará en el biorreactor instrumentado.

## Referencias

- Albarracín V.H. y Fariás M.E. 2012. Biotecnología Turquesa. Hipótesis, Apuntes científicos uniandinos. Universidad de los Andes, núm. 13.
- Chenu, C. 1993. Clay—or sand—polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water related properties and microstructure. In *Soil Structure/Soil Biota Interrelationships* (pp. 143-156). Elsevier.
- DuBios M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt Chem* 28:350–356
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry*, 339(1), 69-72.
- Rogoff D., Rothschild L.J., Bishop J., Carpenter E.J., The ultraviolet (UV) protecting pigment in cyanobacteria, scytonemin: the effects of the external protectant, iron, and its implications for life on Mars, *Astrobiology* 5 (2005) 317–318.
- Sinha R.P., Singh S.P., Hañder D.-P., Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 89 (2007) 29–35.
- 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.