

Crecimiento y metabolismo de *Fischerella TB22* en medio de cultivo BG11⁰

(*Growth and metabolism of Fischerella TB22 in BG110 culture medium*)

Martínez-Rosales, A.¹, Trujillo-Tapia, M. N.^{1*}, Ramírez-Fuentes, E.¹

¹ Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel. Carretera Puerto Ángel-Zipolite Km. 1.5. Cd. Universitaria S/N. C.P. 70902. San Pedro Pochutla, Oaxaca, México. Tel: (+52 958) 584 3057

*Autor para correspondencia: nieves@angel.umar.mx

RECIBIDO: 11 de agosto 2020

APROBADO: 1 de septiembre 2020

DOI: 10.22370/bolmicol.2020.35.1.2425

Palabras claves: Cianobacteria, amonio, fotobioreactores, crecimiento microbiano, sonicación, densidad óptica.

Keywords: Cyanobacteria, ammonia, photobioreactors, microbial growth, sonication, optical density.

RESUMEN

Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre, abarcan una gama morfológica que va desde los organismos unicelulares como las bacterias y algunas cianobacterias, hasta multicelulares, filamentosas, por ello es importante conocer cómo se comportan y se puede saber haciendo una curva de crecimiento microbiano. Para este estudio se prepararon 4 fotobioreactores de columna burbujeada con inóculo de *Fischerella TB22*, se pusieron en aireación constante con 12 horas luz y 12 horas oscuridad durante 40 días con diferentes tratamientos de ajuste de volumen del medio de cultivo y ajuste del pH. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento en biomasa por peso seco, densidad óptica, pH y amonio de *Fischerella sp.* en medio de cultivo BG11⁰ durante 12 días. Las variables que se midieron de la curva de crecimiento de las cianobacterias, siguieron el patrón de una curva típica de crecimiento microbiano.

ABSTRACT

Free-living nitrogen-fixing microorganisms cover a morphological range that goes from unicellular organisms such as bacteria and some cyanobacteria, to multicellular, filamentous, therefore it is important to know how they behave and can be known by making a microbial growth curve. For this study, 4 bubbled column photobioreactors with *Fischerella TB22* inoculum were prepared, they were placed in constant aeration with 12 hours of light and 12 hours of darkness for 40 days with different treatments of volume adjustment of the culture medium and pH adjustment. The objective of this work was to evaluate the biomass growth by dry weight, optical density, pH, and ammonia of *Fischerella sp.* in the BG11⁰ culture medium for 12 days. The variables that were measured from the growth curve of cyanobacteria followed the pattern of a typical microbial growth curve.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las microalgas se han convertido en una fuente prometedora y sustentable para la producción de compuestos de interés comercial, ya que al ser microorganismos autótrofos solo requieren de agua, luz (como fuente de energía) y CO₂ (como fuente de carbono)¹. Las cianobacterias son microorganismos procariontes conocidos como algas verde-azules o cianofitas². Por muchos años las cianobacterias fueron consideradas algas verdes azuladas debido a su fototrofia oxigénica. La estructura fina de las cianobacterias es bien conocida³. Son organismos fotoautótrofos, que realizan la fotosíntesis con liberación de oxígeno, presentan clorofila a como pigmento fotosintético primario y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares⁴. Algunos microorganismos en especial las

cianobacterias se reproducen por división celular, por lo cual presentan un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas. Las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, por lo cual, se modifica también la velocidad de crecimiento poblacional⁵. El crecimiento de un cultivo se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cél/mL), en peso seco (total y/u orgánico), cantidad de proteína, de pigmentos, medidos directamente o en unidades arbitrarias de fluorescencia, volumen de las células o carbono celular total, calculado para un período de tiempo o una fase de crecimiento específica⁶. Esto permite reconocer diferentes fases de crecimiento (figura 1), las cuales sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o biomasa.

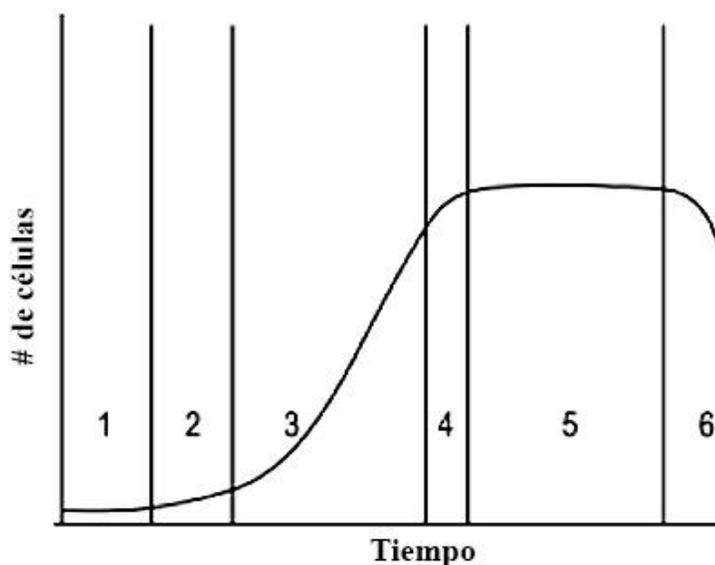


Figura 1. Curva típica de crecimiento microbiano. 1.- Fase lag, 2.- Fase de aceleramiento, 3.- Fase exponencial, 4.- Fase de desaceleración, 5.- Fase estacionaria, 6.- Fase de muerte.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre abarcan una gama morfológica que va desde los organismos unicelulares como las bacterias y algunas cianobacterias, hasta multicelulares, filamentosas⁷ como *Fischerella TB22*, que presentan ramificaciones, son capaces de generar fotosíntesis oxigénica, sintetizar

clorofila a, poseen al menos una ficobiliproteína, sintetizan glucógeno como producto de almacenamiento, presentan paredes celulares provistas de azúcares, aminos y aminoácidos⁸. Son organismos fijadores de nitrógeno donde la enzima que utilizan es la nitrogenasa⁹. Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno

contribuyen en gran medida a la presencia de nitrógeno en hábitats terrestres y acuáticos¹⁰. *Fischerella TB22* en particular, que tienen a la nitrogenasa confinada en los heterocitos, los cuales son células especializadas, distribuidas a lo largo o al final del filamento. Los heterocitos están rodeados de una pared glucolipídica gruesa que reduce la difusión del oxígeno hacia las células, cualquier oxígeno que se difunda hacia los heterocitos es reducido rápidamente por hidrógeno; así, la fijación de nitrógeno está espacial y metabólicamente separada del proceso fotosintético. Los heterocitos tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes, de tal manera que existe un continuo movimiento de los productos de la fijación de nitrógeno desde los heterocitos hacia las células vegetativas y de los productos fotosintéticos desde las células vegetativas hacia los heterocitos¹¹. El modelo¹² de un heterocisto de *Fischerella sp.* con uniones a una célula vegetativa a cada lado (figura 2), enfatiza la situación para N. El heterocisto se caracteriza por una envoltura que comprende una capa de

glicolípidos, que forma la barrera principal para la difusión del gas (flechas delgadas) y una capa de polisacárido. La envoltura rodea una pared celular con una membrana externa, una capa de peptidoglicano y una membrana plasmática. Si el aire ingresa o no a los heterocistos a través de las células vegetativas puede regularse mediante un mecanismo de apertura / cierre (representado conceptualmente por flechas naranjas). El O₂ se respira, produciendo ATP. El N₂ y O₂ compiten por los electrones que se importan como sacarosa de las células vegetativas. Los poros en los extremos de los heterocistos a veces pueden contener cianofina (polímero de poliaspartato-multiarginina). Las enzimas involucradas en el proceso de fijación de N son la Nase: nitrogenasa y CytOx: citocromo oxidasa; además de [H]: equivalentes reductores (NAD (P) H, FdH) derivados del metabolismo de la sacarosa. ¹³afirma que *Fischerella sp.* mostró capacidad para crecer en un medio de cultivo selectivo (sin nitrógeno), y así comprobar que el amonio medido en el medio es por fijación de N₂.

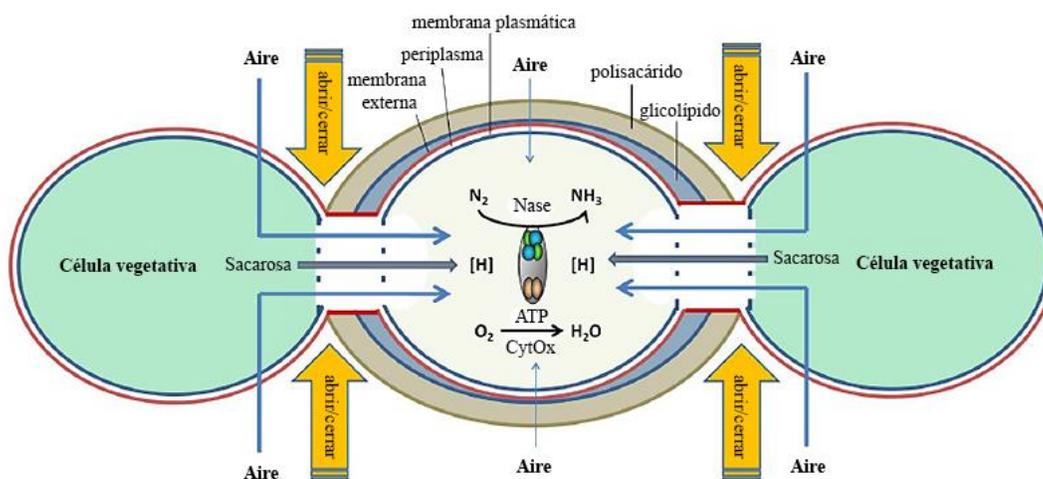


Figura 2. Modelo de un heterocisto con uniones a una célula vegetativa a cada lado¹².

METODOLOGÍA

Se prepararon 4 fotobioreactores de columna burbujead¹⁴ con 500 ml de medio de cultivo¹⁵ BG11⁰ con inóculo de *Fischerella TB22* (figura

3) al 1% (p/v), se pusieron en aireación constante con 12 horas luz y 12 horas oscuridad durante 40 días¹⁶ a 35° C, el inóculo fue obtenido de la cepa del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Mar en fase estacionaria¹⁷. Los

tratamientos por triplicado fueron T1 donde se ajustó el pH del medio al pH inicial, T2 donde se ajustó el volumen (vol) del medio de cultivo, T3

donde se ajustó pH y vol y T4 donde habrá ningún ajuste. Se tomaron 5 muestras de cada tratamiento para su análisis el día 0, 3, 6, 9, 12.

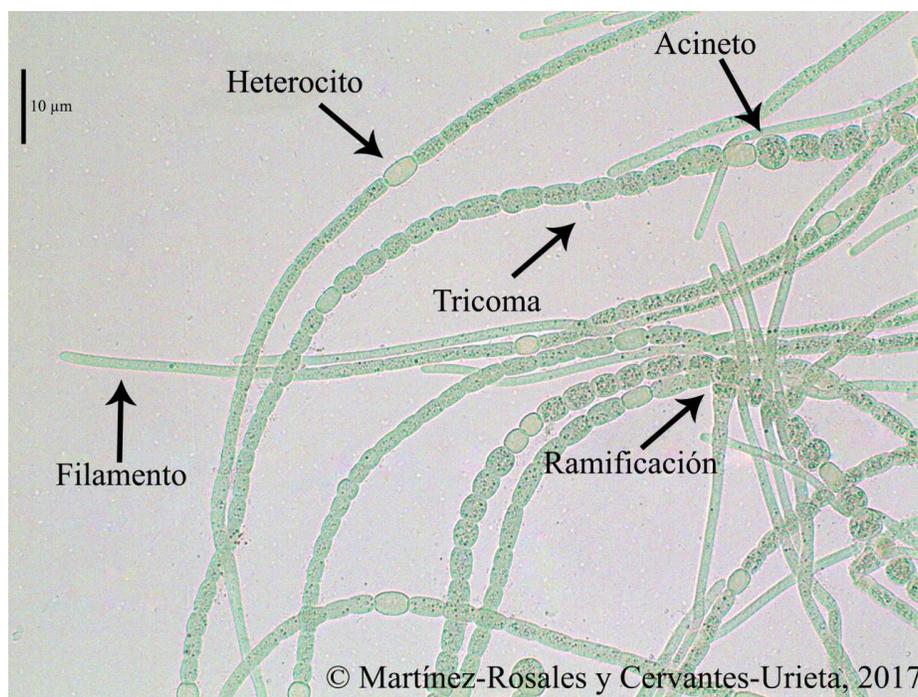


Figura 3. Identificación de células especializadas de *Fischerella TB22* con fotografía en microscopio a 40X.

VARIABLES A EVALUAR

Para la biomasa por peso seco (BPS) se utilizaron filtros cualitativos de 40 mm de diámetro y con una abertura de poro de 5-8 μm , se enjuagaron con agua acidificada a pH 4¹⁸, y se colocaron en una estufa a 70°C por 24 horas y se colocaron en un desecador durante 24 horas más para obtener peso constante. Se tomaron una alícuota de 1 mL de cada tratamiento por triplicado las cuales se filtraron con la ayuda de una bomba de vacío, posteriormente los filtros se colocaron en la estufa a una temperatura de 70°C durante 24 horas. Se tomó el peso final del papel y el peso seco de biomasa se obtuvo por diferencia de peso¹⁹. Para la densidad óptica (DO) se sonicaron las muestras durante 5 minutos a una frecuencia de 42 \pm 6 khz. Se tomó una alícuota de 1 ml de muestra de cada tratamiento por triplicado, se adicionó 1ml de BG11⁰, se midieron en un espectrofotómetro UV/Vis a 550 nm. Para la medición de amonio

en el medio de cultivo (NH₄⁺) se usó la técnica del manual²⁰. Se tomó una alícuota de 5 ml de muestra de cada tratamiento por triplicado y se pusieron a centrifugar en tubos Falcon a 3500 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante a otro tubo y se agregó: 1 gota (0.05 ml- 50 μL) de MnSO₄ 0.003M., 0.5 mL de NaClO y 0.6 mL de Fenato inmediatamente después de la solución de NaClO. Se agitó vigorosamente tras cada adicción. Se dejaron reposar 10 min y se midieron a una absorbancia de 630 nm en un espectrofotómetro UV/Vis. La lectura del pH se tomó con un potenciómetro marca Hanna modelo HI5221 directamente en el medio de cultivo de cada tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar con análisis de medidas repetidas. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Statistica versión 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No hubo diferencia en las variables evaluadas entre tratamientos, pero sí entre días. El mayor crecimiento en biomasa ocurrió en el día 9 y 12 (figura 4a) no existiendo diferencias significativas entre ellos: se obtuvieron en promedio 6.8 ± 0.12 mg de NH_4^+ y 7 ± 0.18 mg el día 12. ²¹ reportaron en un experimento similar con *Fischerella sp.* en condiciones de aireación la producción de amonio de 0.44 ± 0.13 mg L⁻¹ a los 5 días, en este trabajo la producción de amonio de *Fischerella TB22* (figura 4b) a los 5 días fue superior (20 mg L⁻¹), esto puede ser atribuido a que estudiaron una especie diferente a la este trabajo, reportaron también con *Fischerella sp.* 8.34 ± 0.72 mg L⁻¹ de clorofila, en este trabajo *Fischerella TB22* reportó en el T4 8.03 ± 0.2 mg L⁻¹ (figura 4c), siendo T4 el mejor

tratamiento en esta variable. El ajuste de pH y vol en el T3 (figura 4d) mostró mejor producción de amonio en el día 9. Los resultados de biomasa (figura 4a) y pH (figura 4d) confirman lo dicho por²² que las cianobacterias son capaces de mantener un crecimiento sostenido entre un pH de 6,0 y 10,0 con un óptimo a pH 8,0. Se coincide con²³ en que la variación del pH está directamente relacionada con el incremento celular debido al aumento en el consumo de CO₂, trayendo como consecuencia la alcalinización del medio. El pH se incrementó debido al consumo del fósforo por las cianobacterias, esto debido a que el medio de cultivo perdió su capacidad de amortiguamiento como reportan²⁴ en su trabajo con microalgas, para evitar pérdidas de biodisponibilidad de P, sin embargo, en este trabajo no afectó en el rango de crecimiento.

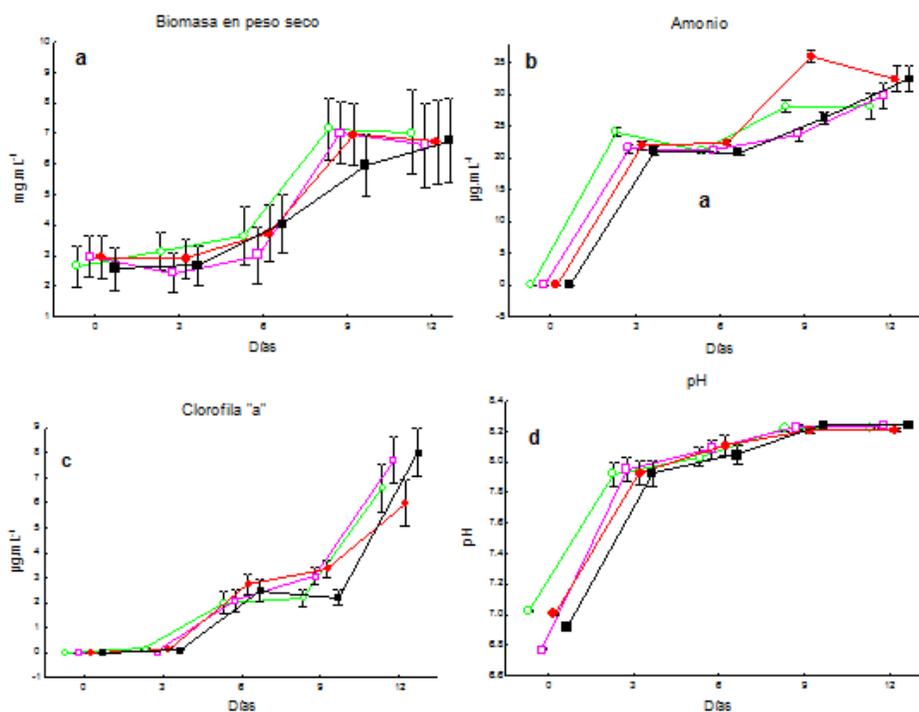


Figura 4. a) Biomasa en peso seco. b) Concentración de amonio. c) Clorofila "a". d) Medición de pH de *Fischerella TB22*

T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG11⁰, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG11⁰, T4= (■) control sin ajustes.

Los resultados de DO (figura 5) demostraron la misma tendencia que la biomasa en peso seco.

La sonicación ayudó a homogenizar el inóculo además de separar las células encadenadas y

facilitó las mediciones por espectrofotometría. Se encontró una relación positiva (figura 6) entre

la medición de absorbancia y el peso seco según $(y = 0.022e^{0.048x}, R^2 = 0.948)$.

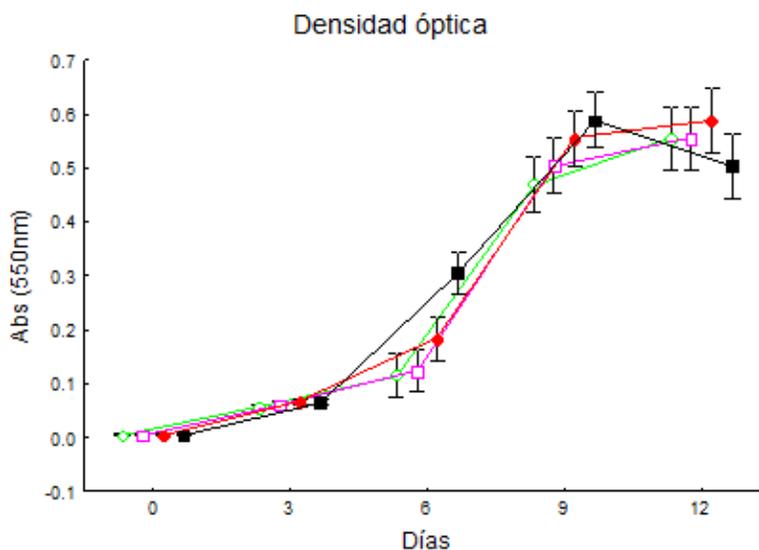


Figura 5. Densidad óptica de *Fischerella TB22*. T1= (○) Ajuste de pH, T2= (□) Ajuste de volumen de medio BG11⁰, T3= (●) Ajuste de pH y volumen de medio BG11⁰, T4= (■) control sin ajustes.

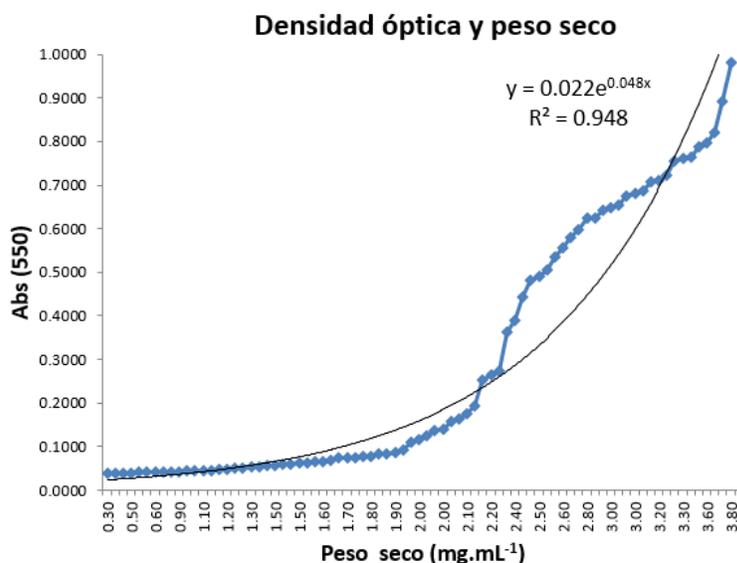


Figura 6. Relación entre la densidad óptica y peso seco de *Fischerella TB22*.

En el mismo periodo de cinética con consorcios cianobacterianos, ¹⁶ y ²⁵ obtuvieron resultados similares (Tabla 1), las diferencias en las variables evaluadas se atribuyen a que hubo

diferentes géneros en las cepas evaluadas, en este trabajo se utilizó únicamente a *Fischerella TB22* aislada.

Tabla 1. Comparación de resultados de trabajos con cianobacterias.

	pH	Biomasa (mg)	DO (abs)	CLa ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	NH ₄ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
16 *	6.8 ±0.10	8.12 ±0.05	0.4 ±0.01	10.42 ±0.63	34.5 ±4.6
25 *	N/A	5.8 ±0.1	N/A	4.12 ±0.95	12.70 ±3.8
Este trabajo	8.22 ±0.01	6.95 ±0.61	0.4 ±0.09	7.7 ±0.94	30.7 ±2.08

*Utilizaron consorcios de cianobacteria

CONCLUSIONES

Las variables que se midieron de la curva de crecimiento de las cianobacterias, siguieron el patrón de una curva típica de crecimiento microbiano. El noveno día de crecimiento de *Fischerella TB22* es el mejor para la aplicación como biofertilizante ya que tiene su máxima producción de amonio. Recuperar el volumen y mantener el pH como al inicio no fue relevante para su desarrollo. Las cianobacterias mantuvieron su crecimiento en el rango del pH de 7.3 a 8.6. La sonicación ayudó a homogenizar el inóculo y facilitó las mediciones por espectrofotometría.

REFERENCIAS

1. Benavente-Valdés, J. R., et al. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Acta Química Mexicana, 2012, vol. 4, no 7, p. 1-12. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores

2. Lee, E. Phycology (3rd Edition). Estados Unidos: Cambridge University Press. 1999.

3. Campos, Victoriano, et al. Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. Boletín Micológico, 2005, vol. 20. Disponible en:

<https://micologia.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/279>

4. Ho, Ming-Yang, et al. Extensive remodeling of the photosynthetic apparatus alters energy transfer among photosynthetic complexes when cyanobacteria acclimate to far-red light. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2020, vol. 1861, no 4, p. 148064. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272819301033>

5. Arredondo Vega, B. O., Voltolina, D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 2007, vol. 1, p. 17-25. Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Domenico_Voltolina/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO/links/00b4953c92711ed8fb000000.pdf

6. Arredondo Vega, B.O., Cordero Esquivel, B., Herrero, C. y Abalde, J. Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología. Manual de Prácticas del 1er. Curso Teórico Práctico: Aplicaciones Biotecnológicas del Cultivo de Microalgas. La Paz, Baja California Sur, México. Septiembre 1-5, 1997; 40 págs.

7. Mayz-Figueroa, J. Biological Nitrogen Fixation. Revista Científica UDO Agrícola, 2004; 4(1), 1-20. Disponible en:

<http://www.bioline.org.br/abstract?cg04001>

- 8. Carr, N., y Whitton, B.** The Biology of Cyanobacteria (2nd Edition). California: University of California at Berkeley Press. 1982.
- 9. Stainer, R., Ingraham, J., Wheels, M., y Painter, P.** Microbiología Segunda Edición. Barcelona: Editorial Reverté. 2005.
- 10. Freire, Elizabeth; Koch, Alma; Salvador, Lorena.** Evaluación del potencial biofertilizante de consorcios de Cianobacterias en pasto Raygrass (*lolium multiflorum*). ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana, 2016, vol. 4, no 1. Disponible en: <https://revistaecuadorestcalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestcalidad/index.php/revista/article/view/27>
- 11. Todar, K.** Textbook of bacteriology. Important groups of prokaryotes. 2015; <http://www.textbookofbacteriology.net>
- 12. Stal, Lucas J.** The effect of oxygen concentration and temperature on nitrogenase activity in the heterocystous cyanobacterium *Fischerella sp.* Scientific Reports, 2017, vol. 7, no 1, p. 1-10. Disponible en <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05715-0>
- 13. Martínez A. K.** Establecimiento de las condiciones de cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas de suelos cultivados de papaya. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca. 2010.
- 14. Reichert, Carolina da Cruz; Reinehr, Christian Oliveira; Costa, Jorge Alberto Vieira.** Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2006, vol. 23, no 1, p. 23-28. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-66322006000100003&script=sci_arttext
- 15. Rippka, Rosmarie, et al.** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology, 1979, vol. 111, no 1, p. 1-61. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-111-1-1>
- 16. Ramírez-López C.** Efecto de la aireación y la irradiación sobre un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel. 2009; 84 pp.
- 17. Vonshak, A.; Maske, H.** Algae: growth techniques and biomass production. En Techniques in bioproductivity and photosynthesis. Pergamon Press, Oxford, 1982. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/contributions/Vonshak-A/1980.-Vonshak-AL.pdf>
- 18. Vonshak, Avigad.** Spirulina: Growth, Physiology and. *Spirulina Platensis* Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology, 1997, p. 43. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=RUIZZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA43&dq=Spirulina:+growth,+physiology+and+biochemistry:+Physiology+cell-biology+and+Biotechnology.+&ots=zdOsR_Xij&sig=w7dnsDPz0V8kXIu_93hwASMZ3E8#v=onepage&q=Spirulina%3A%20growth%2C%20physiology%20and%20biochemistry%3A%20Physiology%20cell-biology%20and%20Biotechnology.&f=false
- 19. Arredondo-Vega, B., Cordero-Esquivel, B., Voltolina, D.** Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Capítulo 4. 2007; 31-34 pp.
- 20. APHA-AWA-WPCF.** Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th

edition. American Public Health Association. Washington. D. C., U. S. A. 1992.

21. Rajabnasab, Mahboobeh, et al. Adaptation of the *Cyanobacterium fischerella* sp. ISC 107 to the combined effects of pH and carbon dioxide concentration. *Plant Physiology*, 2017, vol. 7, no 4, p. 2163-2171. Disponible en: http://ijpp.iau-saveh.ac.ir/article_537981.html

22. Morales, Ever, et al. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia*, 2002, vol. 27, no 7, p. 373-378. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33907007.pdf>

23. Brito, D. J., et al. Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum* Efecto de tres fuentes de nutrientes en la producción de biomasa y pigmentos de la microalga dulce acuícola *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*, 2016, vol. 4, no 1, p. 15-26. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Julio-Colivet/publication/303401862_Effect_of_three_sources_of_nutrients_on_biomass_and_pigment_production_of_freshwater_microalgae_Hyaloraphidium_contortum/links/5740efdb08ae9f741b34e4bf/Effect-of-three-sources-of-nutrients-on-biomass-and-pigment-production-of-freshwater-microalgae-Hyaloraphidium-contortum.pdf

24. Beltrán-Rocha, Julio C., et al. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de biología marina y oceanografía*, 2017, vol. 52, no 3, p. 417-427. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-19572017000300001&script=sci_arttext&tlng=p

25. Alonso-Santos E., Trujillo-Tapia Ma. Y Ramírez-Fuentes E. Crecimiento de

Fischerella sp. (Stigonematales: Cyanobacteria) en ausencia de nitrógeno y carbonatos. *Tendencias de Investigación en Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*. 2015; Pag. 8-17. ISBN 978-607-9453-08-4. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Isaac-Lucas/publication/298215267_Tendencias_de_Investigacion_en_Biotecnologia_y_Ciencias_Agropecuarias/links/56e7318f08ae4c354b1a7b89/Tendencias-de-Investigacion-en-Biotecnologia-y-Ciencias-Agropecuarias.pdf