

ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS EN BACTERIAS DEL SUELO

Análisis de Microorganismos de Referencia

A. Supanitsky¹, D. Russo², N. Vozza², A. Zorreguieta²
¹INTI Centro de Celulosa y Papel, ²Fundación Instituto Leloir
asupanit@inti.gov.ar,

INTRODUCCIÓN

Los biofilms ó biopelículas bacterianas son comunidades de bacterias intercomunicadas, que crecen embebidas en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie inerte ó a un tejido vivo. El crecimiento en biofilm está directamente relacionado con las condiciones del ambiente.

El estudio de la adherencia de los microorganismos a las distintas superficies, tanto bióticas como abióticas, es central ya que ésta condiciona la formación de biofilm, con sus consecuencias en el área industrial (contaminación de un sistema por la actividad microbiana del biofilm) y del medio ambiente (biofertilización, biorremediación y tratamiento de efluentes)

OBJETIVO

Como objetivo general del trabajo buscamos correlacionar la capacidad de formar biofilms en bacterias del suelo, con su aptitud en el medio ambiente.

En el presente trabajo estudiamos como primera aproximación, la capacidad formadora de biofilms de cepas de referencia sobre una superficie abiótica (poliestireno), variando distintas condiciones de cultivo in vitro, para luego abordar el estudio de aislamientos autóctonos de bacterias provenientes de suelos sometidos a distintas prácticas agrícolas de nuestro país.

DESCRIPCIÓN

De especial interés agrícola resulta el estudio de biofilms de rizobios, simbioses de leguminosas, por su capacidad fijadora de Nitrógeno atmosférico, tanto como de otras rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

Se estudiaron las siguientes cepas de referencia:

- Bradyrhizobium japonicum* USDA 138 (simbionte de soja)
- Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (simbionte de soja)
- Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 (simbionte de soja)
- Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (simbionte de soja)
- Mesorhizobium loti* Ayac 1BII (simbionte de *Lotus* spp.)
- Mesorhizobium loti* MAFF 303099 (simbionte de *Lotus* spp)
- Rhizobium leguminosarum* A34 (simbionte de arveja)

- Rhizobium leguminosarum* 3841 (simbionte de arveja)
- Sinorhizobium meliloti* Rm 1021 (simbionte de alfalfa)
- Sinorhizobium meliloti* Rm 2011 (simbionte de alfalfa)
- Pseudomonas fluorescens* P1 (PGPR)
- Pseudomonas fluorescens* P2 (PGPR)
- Burkholderia vietnamensis* (BCC) GV
- Burkholderia Cepacia* Genomovar

Se cuantificó la formación de biofilm mediante ensayo en microplacas de poliestireno y tinción con Cristal Violeta.

Dicho ensayo se realizó variando distintas condiciones: medio de cultivo (ricos como LB- TY y diferentes medios mínimos), cultivo estático ó en agitación, densidad de la población inicial, tiempo de incubación.

Las bacterias fueron cultivadas a 28° C y 200 rpm, cuando correspondió agitación, partiendo de distintas densidades poblacionales: 0.001, 0.01, 0.1 (DO600nm.). Los tiempos de incubación variaron de acuerdo al tipo de microorganismo (de crecimiento lento ó rápido)

RESULTADOS

De los estudios realizados podemos resaltar la condición de cultivo en que cada microorganismo analizado mostró mayor adherencia (Tabla1)

Además, pudimos observar la dinámica en la evolución del biofilm y el crecimiento planctónico en los tiempos estudiados para cada situación. Como resultados llamativos encontramos:

- Bradyrhizobium japonicum* USDA110 forma mayor biofilm conforme se aumenta la densidad de la población inicial de bacterias (ODi dependiente), tanto en condiciones de cultivo estático como en agitación (Fig.1 a 3)
- Bradyrhizobium japonicum* SEMIA5079 alcanzó el mismo desarrollo, independientemente de la densidad poblacional inicial (ODi independiente), en condiciones de cultivo estático y en agitación.
- Sinorhizobium meliloti* Rm 1021 desarrolló un máximo de biofilm en todos los tiempos de incubación estudiados (tiempo independiente) a una OD inicial de 0,1 en medio TY, en agitación.

MICROORGANISMO	VARIABLE DE CULTIVO					BIOFILM (OD 595nm)
	MEDIO	AGITACIÓN	ESTÁTICO	ODi (600nm)	TIEMPO	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 138	Y manitol 0,2%	SI	NO	0,001	7 días	0,5
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Y manitol 0,2%	NO	SI	0,1	7 días	1,1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA5080	Y manitol 0,2%	SI	NO	0,1	6 días	1,5
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA5079	Y manitol 0,2%	SI	NO	0,1	7 días	1,8
<i>Mesorhizobium loti</i> Ayac 1BI	AB sacarosa 0,5%	SI	NO	0,1	3 días	0,4
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	Y manitol 0,2%	SI	NO	0,001	4 días	0,55
<i>Rhizobium leguminosarum</i> A34	Y manitol 0,2%	SI	NO	0,01	3 días	0,6
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 3841	Y sacarosa 0,5%	SI	NO	0,1	4 días	0,4
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm 1021	TY	SI	NO	0,1	2, 3, y 4 días	2,5
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm 2011	TY	SI	NO	0,1	2 días	2,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	M63 glucosa 0,2% CAA 0,5%	SI	NO	0,01	26 hs	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P2	M63 glucosa 0,2% CAA 0,5%	NO	SI	0,1	45 hs	0,8
<i>Burkholderia vietnamsis</i> (BCC) GV	M63 glucosa 0,2% CAA 0,5%	SI	NO	0,001	1 día	0,8
<i>Burkholderia Cepacia</i> Genomovar I	M63 glucosa 0,2% CAA 0,5%	NO	SI	0,1	1 día	0,8

Tabla 1

Figura 3: Población inicial 0,1 OD

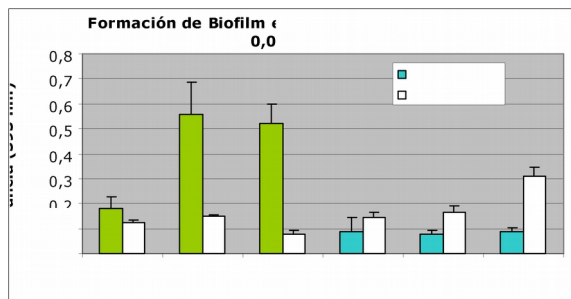


Figura 1: Población inicial 0,001 OD

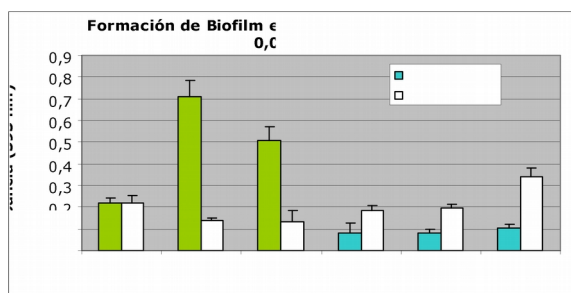
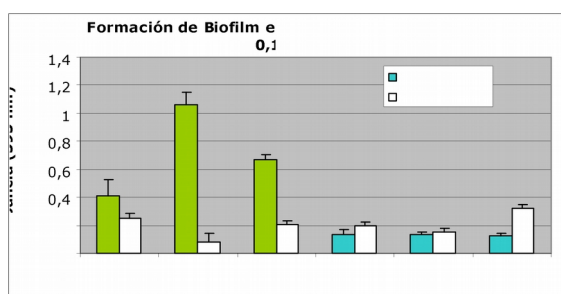


Figura 2: Población inicial 0,01 OD



CONCLUSIONES

En términos generales, podemos decir que la capacidad formadora de biofilms varía considerablemente con:

- 1-la cepa, especie y género de rizobio ensayado
- 2-las condiciones de cultivo.

La agitación mecánica induciría una mayor capacidad de unión a la superficie (poliestireno), situación bastante generalizada dentro de los organismos estudiados. Se observó además que los medios de cultivo mínimos favorecen la formación de biofilm.

En el caso de los rizobios de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*), pudimos ver que a tiempos extensos de incubación (10 días), la estructura del biofilm disminuye. Esto puede deberse a que el sistema utilizado, las microplacas, no serían adecuadas para sostener las condiciones óptimas del cultivo.

En todos los casos estudiados encontramos alguna condición en la cual las bacterias formaron biofilm en mayor ó menor medida (biofilm como propiedad universal)

-El presente trabajo se enmarca en un proyecto de tesis doctoral centrado en el estudio de biofilms bacterianos.
 -Cabe destacarse la colaboración permanente de los Centros de Agroalimentos y de Biotecnología Industrial, en especial del Laboratorio de Microbiología de alimentos a través de instalaciones, equipamiento y asistencia en general