

Impacto de la formación de biofilms bacterianos en la biología del suelo

Supanitsky, Alicia⁽ⁱ⁾; Voza, Nicolás⁽ⁱⁱ⁾; Russo, Daniela⁽ⁱⁱ⁾ y Zorreguieta, Ángeles⁽ⁱⁱ⁾

⁽ⁱ⁾INTI-Programa de Biotecnología

⁽ⁱⁱ⁾Fundación Instituto Leloir

Introducción

Los biofilms ó biopelículas bacterianos 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.

En el hombre los biofilms se asocian con un gran número de procesos infecciosos que por lo general son de transcurso crónico y persistente, lo que hace difícil su erradicación.

En el área industrial y del medio ambiente el papel de los biofilms se centra en el *biofouling* (contaminación de un sistema producido por la actividad microbiana del biofilm) y la biorremediación, ésta última utiliza los biofilms para mejorar las condiciones de un sistema contaminado.

Nuestro objetivo general apunta a determinar en que medida la formación de los biofilms por bacterias del suelo afecta la biología del suelo y consecuentemente la aptitud del mismo para la agricultura. De especial interés agrícola resulta la formación de biofilms de Rizobios, simbioses de leguminosas, por su capacidad fijadora de Nitrógeno atmosférico.

Como primera aproximación se está estudiando la capacidad formadora de biofilms de cepas de referencia sobre una superficie abiótica, variando distintas condiciones de cultivo, para luego comparar con cepas aisladas de suelos provenientes de dos zonas: una con rotación de cultivos y otra sin rotación. Este trabajo se realiza en el marco del Proyecto de Área Estratégica (PAE) plurianual : BIOLOGÍA DEL SUELO Y PRODUCCIÓN AGRARIA SUSTENTABLE ("Conocimiento y uso sustentable de los recursos naturales renovables y protección del medio ambiente. Competitividad y diversificación sustentable de la producción agropecuaria / Biotecnología/ Agroindustrias y agroalimentos")

Metodología / Descripción Experimental

Dado que el proyecto se encuentra en ejecución, la metodología que se emplea corresponde a la utilizada en una primera etapa.

Estudio de la capacidad formadora de biofilms de especies bacterianas de referencia sobre una superficie abiótica:

Cuando una suspensión de bacterias en un medio adecuado se incubaba en el pocillo de una placa multiwell, algunas bacterias se adherirán a la superficie abiótica formando un biofilm mientras que otras permanecerán suspendidas (planctónicas). El cristal violeta tiñe tanto los microorganismos en biofilm como los planctónicos, pero luego de sucesivos lavados permanecen adheridos sólo los que crecieron en biofilm. Así, la intensidad del colorante se correlaciona con la cantidad de biofilm formado.

Actualmente se está cuantificando la formación de biofilm mediante tinción con Cristal Violeta en placa multiwell^[1] (poliestireno).

Las cepas en estudio son:

—*Rhizobium leguminosarum* A34 (simbionte de arveja)

—*Rhizobium leguminosarum* 3841 (simbionte de arveja)

—*Mesorhizobium loti* Ayac 1BII (simbionte de Lotus spp.)

—*Sinorhizobium meliloti* Rm1021 (simbionte de alfalfa)

—*Sinorhizobium meliloti* Rm2011 (simbionte de alfalfa)

Ensayo en microplacas para la formación de biofilms:

—Se cultiva un pre-inóculo de la cepa de interés hasta llegar a fase de crecimiento estacionario ($OD_{600} > 1$ -OD: densidad óptica, como medida de densidad celular-), en agitación a 28°C.

—Se hacen diluciones de los cultivos de acuerdo a la OD requerida y se inocula la microplaca con 200 μ l por well. Cada dilución de los cultivos se siembra en un total de ocho réplicas. Se incluyen ocho réplicas de blancos de los medios de cultivo utilizados.

—Conservando la esterilidad se lee OD a tiempo cero en el lector de placas a 595 nm.

—Se incuba la microplaca a 28°C con y sin agitación (240 rpm), por 24 – 48 hs.

—Se homogeneiza y se mide OD_{595} .

—Se aspira el medio de cultivo suavemente para evitar levantar el biofilm con pipeta automática.

— Se lava cada pocillo con 250 μ l de NaCl 0.9 %. En este paso se eliminan las bacterias planctónicas y restos de medio de cultivo.

—Se agrega a cada pocillo 250 μ l de Cristal Violeta 0.1 % y la placa se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.

—Se aspira el exceso de colorante.

—Cada pocillo se lava con 250 μ l de NaCl 0.9% 3 veces. Con estos lavados se elimina el exceso de colorante y se espera que permanezca el colorante unido a las bacterias ancladas en el biofilm. Se deja secar unos minutos.

—El colorante que penetró en las bacterias adheridas se extrae agregando 250 μ l de EtOH 95% por pocillo.

—El colorante solubilizado en cada pocillo se pasa a una placa multiwell nueva para medir absorbancia a 595 nm.

—La intensidad de color medida se correlaciona así con la cantidad de biofilm presente en cada well.

Dicho ensayo se realiza variando ciertas condiciones:

—medios de cultivo (rico-TY- y mínimo-Y-)

—cultivo estático ó en agitación

—densidad de la población inicial

—tiempo de incubación

Medios de cultivo:

—TY: Bacto-triptona 5g, Bacto-extracto de levadura 3g, $CaCl_2$ 1.3 g, (agar 15 g)

—Medio Mínimo Y:

stocks de sales: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10g cada 100 ml, $CaCl_2 \cdot 5H_2O$ 22g cada 100 ml, K_2HPO_4 22g cada 100 ml, $FeCl_3$ 2g preparado en 0.1 M de HCl cada 100 ml.

Medio sales: 1 ml de cada stock de sales en 1 litro de agua milliQ. Llevar a pH 6.8

En el momento de usar se agregan los siguientes suplementos: Glutamato de Sodio 4.4 % (p/v) 5ml/200 ml de medio Y, Manitol 10% (p/v) 4 ml/200 ml de medio Y, Vitaminas 1 ml/200 ml de medio Y (preparadas en 50 mM Buffer fosfato pH 7: biotina 0.1 g/l, tiamina 0.1 g/l, D/L ácido pantoténico 0.1 g/l)

Mantenimiento de las cepas:

Para el mantenimiento de los microorganismos se hace una resiembra periódica cada tres semanas en placas de medio TY-agar.

Resultados

Se presentan los avances del proyecto que está en ejecución.

Se ensayaron las cepas de *Rhizobium leguminosarum* A34 y *Rhizobium leguminosarum* 3841. Las condiciones de ensayo fueron: medio de cultivo Mínimo Y, con agitación a 240 rpm, durante 24 hs. de incubación a 28°C. Las OD iniciales (600 nm) fueron, para *R. leguminosarum* A34: 0.29, 0.06 y 0.02 y para *R. leguminosarum* 3841: 0.19, 0.07 y 0.03. Los resultados se muestran en la (fig. 1).

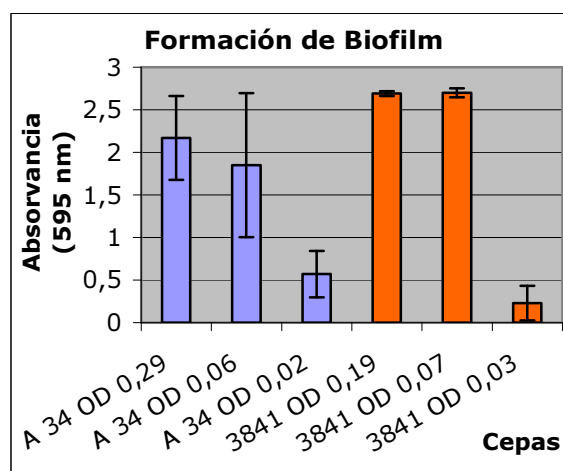


Fig. 1: Cuantificación del biofilm formado por *R. leguminosarum* A34 y *R. leguminosarum* 3841 a distintas densidades de población iniciales por tinción con cristal violeta. Cada valor de absorbancia es el promedio de ocho mediciones.

Se observó que en los cultivos de *R. leguminosarum 3841* en fase estacionaria, se formó un anillo de crecimiento en biofilm en la interfase líquido – aire sobre la superficie de los tubos de vidrio, así como también en los wells de la placa cultivada con esta cepa.

Por otro lado se ensayaron las cepas de *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, *Sinorhizobium meliloti* Rm2011 y *Mesorhizobium loti* Ayac 1BII. Las condiciones de los ensayos fueron: medio de cultivo rico TY, con agitación a 240 rpm y sin agitación, durante 24 hs. de incubación a 28°C. Las OD iniciales (600 nm) fueron, para *S. meliloti* Rm1021: 0.6 y 0.3, para *S. meliloti* Rm2011: 0.5 y 0.3 y para *M. loti* Ayac 1BII: 0.5 y 0.3. Los resultados se muestran en la (fig.2).

Por otro lado, entre los *Sinorhizobium* en estudio, *S. meliloti* Rm2011 formaría una masa mayor de biofilm que *S. meliloti* Rm1021, en condiciones de cultivo con agitación. La agitación mecánica induciría, de alguna manera, una mayor capacidad de unirse a la superficie (poliestireno) o favorecería el crecimiento en biofilm de *Sinorhizobium*, bajo las condiciones ensayadas.

Sin embargo, *M. loti* Ayac 1BII, parecería formar escaso biofilm tanto en agitación como en cultivos estáticos.

Estas observaciones indican que la capacidad formadora de biofilms varía considerablemente con i) la cepa y especie de rizobio ensayada y ii) las condiciones de cultivo.

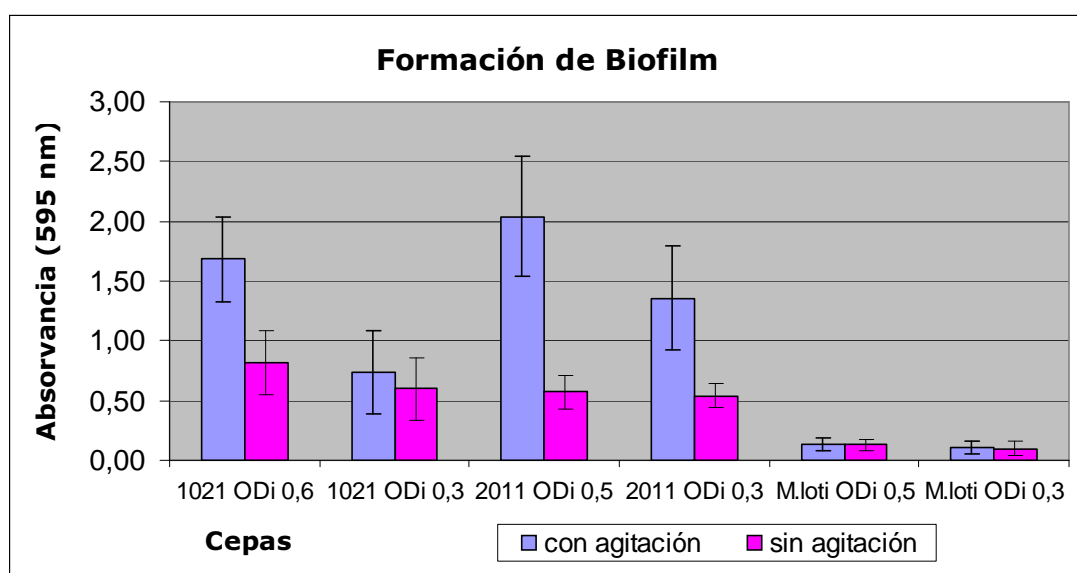


Fig. 2: Cuantificación del biofilm formado por *S. meliloti* Rm1021, *S. meliloti* Rm 2011 y *M. loti* Ayac 1 BII a distintas densidades de poblaciones iniciales por tinción con cristal violeta. Cada valor de Absorbancia es el promedio de ocho mediciones.

Conclusiones

La medida de la formación de biofilm por cada una de las cepas de referencia de rizobios ensayadas fue característica y reproducible. De los primeros resultados y observaciones obtenidos durante el desarrollo de los ensayos podemos decir que: de las dos cepas emparentadas de *Rhizobium*, *R. leguminosarum 3841* tiene mayor capacidad de formar biofilm que *R. leguminosarum A34* bajo las condiciones ensayadas.

Para tener un conocimiento más acabado de la capacidad formadora de biofilms de los microorganismos en estudio, deberán realizarse otros ensayos modificando las distintas condiciones en cultivo. Nos proponemos correlacionar la capacidad formadora de biofilms de aislamientos autóctonos de rizobios (y otras rizobacterias), de los suelos en estudio con su infectividad y supervivencia en el suelo.

Referencias

- [1] McLean, R., Bates, C., Barnes, M., McGowin,, C. and Aron, G. 2004. Methods of studying biofilms. *Microbial Biofilms*, p. 379-413.
- [2] Molin, S., Tolker-Nielsen, T. and Kirlund Hansen, S. 2004. Microbial interactions in mixed-species biofilms. *Microbial Biofilms*, p. 206-221.

[3] Morris, C. and Monier, M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:429-453.

[4] O'Toole, G.A., and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 28: 449-461.

[5] Ramey, B., Koutsoudis, M., von Bodman, S. and Fuqua, C. 2004. Biofilm formation. *Current opinion en Microbiology.* 7: 602-609.

Para mayor información contactarse con:
Alicia supanitsky - asupanit@inti.gov.ar