

TOLERANCIA A ARSÉNICO EN BACTERIAS DEL SUELO: RELACIÓN CON LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS

A. Supanitsky (1), D. Russo (2), W. Draghi (2), L. Wall (3), A. Zorreguieta (2)

(1) INTI Centro de Celulosa y Papel, (2) Fundación Instituto Leloir, (3) Departamento de
Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Quilmes

asupanit@inti.gob.ar

Introducción

La producción agropecuaria ocurre a expensas de la explotación del suelo. La productividad del mismo está determinada por las distintas comunidades de organismos que habitan en él. Resultan de especial interés las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), por su utilización como biofertilizantes y biocontroladoras de enfermedades de plantas. Especies como *Pseudomonas fluorescens* y diversos miembros del género *Burkholderia* han sido utilizados en este sentido.

Así, la supervivencia de dichas bacterias a condiciones ambientales adversas es de suma importancia para la agricultura. En este sentido, cabe mencionar la problemática que implica la presencia natural de arsénico en aguas y suelos de la llanura Chaco-Pampeana de nuestro país, con la consecuente toxicidad en la biota local. Los biofilms o biopelículas bacterianos son comunidades de bacterias intercomunicadas, que crecen embebidas en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo.

La forma de vida en biofilm resulta una posible ayuda en situaciones adversas.

Objetivo

Buscamos correlacionar la capacidad de formar biofilms en bacterias del suelo con su aptitud en el medio ambiente

En particular estudiamos la supervivencia a Arsénico sobre aislamientos bacterianos autóctonos para evaluar su relación con la capacidad de dichas bacterias para formar biofilms.

Descripción

Se estudiaron 18 cepas de *Pseudomonas fluorescens* y 10 variedades de *Burkholderia* spp. provenientes de suelos sometidos a distintas prácticas agrícolas de nuestro país. Para evaluar el efecto del arsénico sobre dichos microorganismos se realizó un ensayo de toxicidad aguda utilizando distintas

concentraciones de arsénico para determinar la concentración letal media (CL50), que se define como la concentración de arsénico a la cual el 50% de los organismos sometidos al ensayo sobrevive en un tiempo determinado (22 horas en nuestro caso).

El arsénico en agua puede encontrarse en sus dos estados de oxidación: As (III) y As (V), arsenito y arseniato respectivamente. Por su mayor toxicidad evaluamos el efecto del As (III). Las concentraciones utilizadas fueron: 0,5 mM, 2,5 mM, 5mM, 12,5 mM y 25 mM. Las bacterias se cultivaron ON a 28°C con agitación en medio LB. Se transfirieron 100 ul de la suspensión bacteriana y 100 ul de cada solución de arsénico a pocillos de una placa de 96 well. Las placas fueron incubadas durante 22 hs a 28°C. Para determinar la cantidad de bacterias viables se realizaron diluciones seriadas en PBS y se plaqueron de modo de hacer recuento en placa en medio LB (fig.1)

Resultados

Observamos que las pseudomonas estudiadas, identificadas como P1 a P18, muestran resultados diversos. En la tabla 1 se muestran en celeste los aislamientos que manifiestan una correlación positiva, destacándose las cepas P12 y P13 como las más tolerantes con una CL50 de 1,03 y 1,15 mM respectivamente y alta capacidad de formación de biofilms: 2,48 de absorbancia (595 nm) del cristal violeta en bacterias adheridas al poliestireno para la cepa P12 y 1,32 para P13. En el otro extremo, la cepa P8 presentó una mortalidad mayor al 50% (en este caso fue del 100%) en la mínima concentración ensayada y fue incapaz de crecer en biofilm.

Por otro lado, las celdas destacadas en rosa corresponden a aislamientos que no correlacionan positivamente: la cepa P3 manifiesta una alta capacidad de adhesión a soporte abiótico, pero su mortalidad a la mínima concentración estudiada fue del 93 %. Los aislamientos de *Burkholderia* involucrados en el estudio presentan baja capacidad de formar biofilms tanto sobre soporte abiótico (PE) como

biótico (raíces de trigo). Bajo las condiciones de ensayo solo uno de ellos resultó tolerante al As (B8), mientras que el resto fue sensible con una CL50 menor a 0.5mM (tabla 1)

Cepa	CL50 (mM)	BIOFILM (Absorbancia 595 nm)
P1	0,93	2,57
P2	<0.5	0,92
P3	<0.5	2,25
P4	0,74	2,39
P5	1,06	0,21
P6	1,12	0,13
P7	<0.5	0,193
P8	<0.5	<0.05
P9	<0.5	0,120
P10	0,68	0,74
P11	1,13	0,27
P12	1,03	2,48
P13	1,15	1,32
P14	0,69	1,80
P15	0,78	1,66
P16	0,81	0,95
P17	0,92	1,83
P18	<0.5	1,45
B8	0,78	<0.05

Tabla 1: Concentración letal media de As (III) / formación de biofilm sobre soporte abiótico (poliestireno)

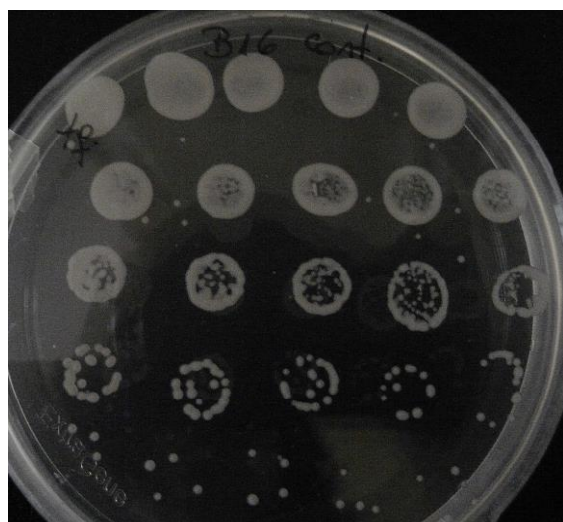


Figura 1: Recuento en placa

Conclusiones

De nuestro estudio podemos decir que las pseudomonas, fuertes formadoras de biofilms, muestran una alta resistencia a la exposición a arsénico, mientras que los aislamientos de burkholderia, con baja capacidad de formar biofilms, resultaron más sensibles ante la exposición al tóxico.

Dentro de los aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* encontramos diversos resultados, pero en general la correlación entre tolerancia al As y formación de biofilms fue positiva.

Logros y resultados del Proyecto

La mínima concentración de arsénico utilizada en el presente trabajo (0,5 mM) supera 750 veces el límite permitido en aguas de consumo en Argentina (0,05 mg/L) y tres veces los valores máximos encontrados en La Francia, provincia de Córdoba (12 mg/L), así podemos decir que los aislamientos de bacterias con una CL50 > 0,5 mM resultan ser altamente tolerantes a los niveles de As encontrados en aguas locales y consecuentemente ideales para ser utilizadas como biofertilizantes en las zonas más comprometidas.

Además pudimos ver que la capacidad de formar biofilms se estaría manifestando en cepas más "robustas" o con alguna ventaja adaptativa; pudiendo ser esta forma de crecimiento comunitario, un factor más de adaptabilidad al medio ambiente.

Cabe destacarse la colaboración permanente de los Centros de Biotecnología Industrial y Agroalimentos, en especial el laboratorio de Microbiología, brindando sus instalaciones, equipamiento y asistencia en general