

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y ACTIVIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL POR *BACILLUS SUBTILIS* SUBSP. *SPIZIZENII*

Gabriela Sarti, Mirta Galelli, Silvia Miyazaki

Área de Agroalimentos. Facultad de Agronomía. UBA. Av. San Martín 4453, 1417 Buenos Aires. Argentina. Mail: miyazaki@agro.uba.ar

Introducción

La biopelícula bacteriana estructuralmente esta constituida por masa microbiana, una matriz mayoritariamente de exopolisacáridos, y en menor cantidad de proteínas, DNA y productos de lisis bacteriana (Stanley y Lazazerra 2005). Estas biopelículas intervienen en la inducción y acumulación de lipopéptidos, alguno de éstos poseen actividad antibacteriana y antifúngica. La síntesis de las biopelículas son gobernadas por factores físicos, químicos, biológicos y diversos factores ambientales como pH, temperatura, nutrientes y osmolaridad los cuales influyen la formación de la misma.

Bacillus subtilis es una bacteria no patógena, Gram positiva, formadora de esporas catalasa positiva, aerobia estricta en su mayoría, móvil, y se encuentra comúnmente en el suelo. Pertenece al grupo de las llamadas "bacterias promotoras del crecimiento vegetal" (PGPR, *plant growth promoting rhizobacteria*), posee la habilidad de colonizar raíces y promover el crecimiento vegetal en forma directa (liberando hormonas u otros compuestos) o indirectamente como agente de control biológico. Según las condiciones de crecimiento esta bacteria puede crecer en forma de vida "libre" (planctónicas) flotando en el medio o bien desarrollando biopelículas.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar en *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* las condiciones de cultivo con diferentes sustratos y temperaturas para desarrollar una matriz de biopelícula robusta para utilizarla como biofertilizante .

Materiales y métodos:

Para la formación de biopelícula *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (colección de cultivos AGRAL. Facultad de Agronomía) se creció en un medio líquido salino, con diferentes fuentes carbonadas simples en concentración 1% y fuente nitrogenada inorgánica, ácido L-glutámico 55mM y en medios complejos ricos en fuentes nitrogenadas orgánicas con y sin el agregado de fuente carbonada (glicerol 1%). Se creció en condiciones estáticas a 30°C durante 96 horas.

En las biopelículas se determinó el número de células viables. Para caracterizar a la matriz se determinó cualitativamente el contenido de carbohidratos (hidrólisis ácida con HCl 6N y TLC) y cuantitativamente según Dubois *et al.* 1956.

Inoculación: las semillas desinfectadas de *Lactuca sativa* e inoculadas con cultivo líquido de *Bacillus* en su forma de vida planctónica (10^8 UFC mL⁻¹), se mantuvieron en oscuridad durante 5 días hasta aparición de la radícula. En otras se depositó asépticamente una fina porción de biopelícula cubriendo parcialmente la raíz.

Se realizaron los siguientes 3 tratamientos: A) Tierra fértil tindalizada sin inocular, B) Tierra fértil tindalizada con inoculación de raíces con *Bacillus* en su forma planctónica, C) Tierra fértil tindalizada con aplicación de biopelícula proveniente de *Bacillus* sobre raíces. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y se usó la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para comparar las medias de los tratamientos.

Resultados:

La cantidad de biopelícula (expresada en mg de biopelícula/ml cultivo) que se obtuvo utilizando las siguientes fuentes carbonadas: glucosa, galactosa, fructosa, xilosa, hexano, biodiesel, glicerol y manitol fueron respectivamente 0,94; 0,50; 0,57; 0,16; 0; 0; 1 y 1,2. La cantidad de biopelícula (expresada en mg de biopelícula/ml cultivo) que se obtuvo utilizando los medios complejos caldo nutritivo, peptona y extracto de levadura fueron respectivamente: 0,4; 0,37 y 0,6.

La biopelícula obtenida utilizando extracto de levadura en concentraciones 0,1%, 0,5%, 1% y 1,5% fueron respectivamente: 0; 0,10; 0,58 y 2,12 mg biopelícula/ml cultivo. Cuando se combinaron las concentraciones anteriores de extracto de levadura con glicerol 1% se obtuvieron: 0; 0; 0,38 y 0,40 mg biopelícula/ml cultivo respectivamente.

Trabajando a las temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C y 45°C, las biopelículas obtenidas fueron 0,66; 1,04; 1,34 y 0,58 mg biopelícula/ 1 ml cultivo. Sobre cada una de éstas biopelículas se desarrollaron respectivamente $7,9 \cdot 10^7$; $3,3 \cdot 10^7$; $7,7 \cdot 10^7$ y $1,1 \cdot 10^{10}$ unidades formadoras de colonias bacterianas/mg biopelícula. El 80% del peso seco de esta matriz está constituida por exopolisacáridos, con diferentes monómeros.

Se observó un mayor espesor de la matriz cuando *B. subtilis* fue crecida en el medio complejo extracto de levadura 1,5%. Sin embargo cuando se utilizó glicerol 1%, si bien la matriz era más fina, mostró ser más robusta ante la aplicación de métodos físicos de disgregación.

Efecto de la inoculación de *Lactuca sativa* con *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*:

Tratamientos	Parte aérea mg/planta	% Control	Raíz mg/planta	% Control
Tierra fértil tindalizada sin inocular (control)	143 ± 21	100	23 ± 4	100
Tierra fértil tindalizada inoculado con <i>Bacillus</i> en su forma planctónica	271 ± 60	189	21 ± 5	97
Tierra fértil tindalizada con aplicación de biopelícula	340 ± 74	237	47 ± 6	204

Tabla1. Desarrollo de plántulas de *Lactuca sativa* de 10 días inoculadas con *Bacillus* en sus estadios planctónico y biopelícula.

Conclusiones:

El medio de cultivo y la concentración de los sustratos fueron factores que influyeron en la arquitectura de las biopelículas formadas. *Bacillus subtilis* fue capaz de desarrollar en la interfase aire/ líquido de medios simples y complejos una biopelícula con estructuras tridimensionales marcadamente diferentes, las diferencias fueron a nivel de entramado, espesor y robustez.

La estructura exacta de cada biopelícula probablemente sea una característica única del ambiente donde el mismo se desarrolla. Las condiciones físicas y nutricionales que se desarrollan tanto en el laboratorio como en condiciones naturales afectan las características de la biopelícula obtenida.

En los inoculantes comerciales, generalmente las bacterias se encuentran en su estado planctónico, un enfoque innovador para mejorar su efecto promotor del crecimiento vegetal podría ser el contacto íntimo entre planta –bacteria y esto podría lograrse con la utilización de las biopelículas con la bacteria *B.subtilis* atrapada en la matriz. En este trabajo hemos demostrado el efecto benéfico del sistema biopelícula-bacteria con respecto a los inóculos líquidos comerciales.

Referencias:

Dubois M.et al. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. (3) Vol. 28.

Stanley N.; Lazazzera B. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect biofilm formation Molecular Microbiology 57(4), 1143–1158.