

Remoción biológica de *Microcystis aeruginosa* a partir de *Achromobacter xylosoxidans*, microorganismo aislado del Río de la Plata

MAXIMILIANO J. FALLICO*, JORGE E. SAMBETH**
Y LEDA GIANNUZZI*³²

Introducción

Microcystis aeruginosa y microcistinas

El aumento de las floraciones de cianobacterias, ligado al cambio climático y la eutrofización de cuerpos de agua, es una preocupación a nivel mundial. Estos microorganismos son de amplia distribución geográfica y se los puede encontrar tanto en ambientes acuáticos como terrestres. Numerosas especies de diversos géneros que habitan reservorios y cuerpos de agua dulce, en determinadas condiciones ambientales (altas temperaturas, aumento de nutrientes –sistemas eutrofizados–) pueden causar problemas al medio ambiente y a la salud humana y animal. En dichas condiciones, se produce un incremento significativo de la biomasa en horas o días, llamada floraciones o *blooms*. Las floraciones pueden trasladarse hacia las orillas provocando daños importantes en aguas que son utilizadas como lugares recreativos, pero lo que es aún más importante, pueden estar presen-

tes en reservorios y fuentes de agua destinados a consumo humano y animal, ampliamente distribuidas por todo el país.

Se ha estimado que la mayoría de las floraciones de cianobacterias son nocivas porque producen y liberan al medio compuestos tóxicos (cianotoxinas). Estas se agrupan por su modo de acción en hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas), neurotoxinas (saxitoxinas) y dermatotoxinas.

Las microcistinas (MCs) son producidas por diferentes géneros de cianobacterias tales *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* y *Nostoc* y están presentes en cuerpos de agua dulce de todos los continentes.

La Hepatitis Tóxica Aguda asociada con los fenómenos de florecimientos cianobacteriales es ahora reconocida como una Toxicosis Cianobacteriana a raíz de la intoxicación por MCs. Además, existe una fuerte correlación entre cáncer primario de hígado y la contaminación con cianobacterias de las fuentes de agua dulce que utiliza la población aun en ausencia de casos agudos como los mencionados.

En los últimos años resulta significativo el aumento de la frecuencia e intensidad de estos fenómenos a nivel mundial, produciendo un fuerte impacto sanitario, económico y ambiental al afectar un recurso vital como el agua.

Las cianobacterias del género *Microcystis* son las responsables de más del 60% de los casos de intoxicación por cianotoxinas en todo el mundo. Estas producen hepatotoxinas, siendo las MCs las más frecuentemente encontradas. Son heptapéptidos monocíclicos que tienen un aminoácido inusual, Adda ((2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-penildecá-4,6-dienoico ácido), que es esencial para su actividad biológica (Figura 99). Al presente, se han descrito más de 90 variantes de MCs, con distinto grado de toxicidad.

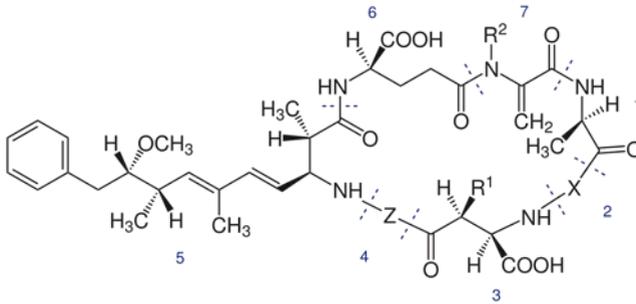


Figura 99. Estructura de la Microcistina

Las MCs son metabolitos secundarios, de síntesis no ribosomal, producidos por péptido sintasas (codificadas en grandes operones) y luego liberados al cuerpo de agua por lisis celular. Una misma cepa cianobacteriana puede producir más de una variante de MC. Dentro de las MCs, la variante LR (MC-LR, donde L y R representan el aminoácido variable leucina y arginina, respectivamente) ha sido asociada con la mayoría de los incidentes de toxicidad que involucran a las MCs y ha sido identificada como una de las toxinas de mayor prioridad a ser estudiada, dados sus efectos sobre la salud humana, su ocurrencia en cuerpos de agua, la resistencia a los tratamientos rutinarios dados en las plantas potabilizadoras y su estabilidad (U.S. EPA 2001).

Aunque el blanco primario de la MC-LR es el hígado, se sabe que afecta también al riñón, cerebro y el tracto gastro-intestinal. En el hígado las MCs son potentes inhibidores de serin/treonin-fosfatasa de proteínas tipo 2A (PP2A) y tipo 1 (PP1). Esto provoca una hiperfosforilación de ciertas proteínas, entre ellas, las citoqueratinas que cumplen su función biológica en la organización de los microfilamentos de actina. Asimismo, se ven afectados los procesos de control de la división y respiración celular.

La intoxicación aguda con MCs se caracteriza por un importante daño al hígado, que deriva en hemorragias intrahepáticas seguida de

muerte debida a congestión hepática y shock hipovolémico (Gianuzzi y col., 2011).

Debemos tener en cuenta de manera especial la exposición de tipo crónica, la cual hasta el momento no ha sido suficientemente estudiada. Esto resulta particularmente importante debido a que la intoxicación crónica sería la forma más probable de exposición para la población. La exposición crónica se caracteriza por una amplia gama de daños hepáticos, entre los que destacan, vacuolización citosólica, necrosis celular puntual y promoción de tumores.

La Organización Mundial de la Salud categorizó a la MC-LR como un carcinógeno probable para humanos y estableció un límite máximo permitido de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ en aguas para bebida (WHO, 2010).

Epidemiología

Muchas cianobacterias son formadoras de floraciones en cuerpos de agua. En Argentina, se han detectado floraciones de cianobacterias en casi todas las provincias (Figura 100) siendo *Microcystis* y *Dolichospermum* los géneros dominantes en un 60% seguido por *Planktothrix/Oscillatoria* (14%), *Chroococcus* y *Pseudoanabaena* (8%), *Aphanizomenon* (7%) y *Cylindrospermopsis* (4%) (Ministerio de Salud, 2016).



Figura 100. Distribución geográfica de la ocurrencia de cianobacterias en Argentina. Sitio web Ministerio de Salud, Dirección de Determinantes de Salud (2016).

Métodos de control de florecimientos cianobacterianos

Existen diversos métodos disponibles para el control de los florecimientos cianobacterianos. La disminución de nutrientes en lagos, especialmente el fósforo (nutriente limitante en ecosistemas), puede ser aplicada como un método preventivo para evitar proliferación de cianobacterias. El ingreso de nutrientes a los lagos puede darse por fuentes puntuales (descargas de efluentes domésticos e industriales) y fuentes no puntuales (deriva de agroquímicos; escorrentía proveniente de suelos erosionados). Sin embargo, para reducir el ingreso

de nutrientes, se requieren largos tiempos para la corrección del paisaje y la restauración del cuerpo de agua.

Métodos de remoción físicos

Son diversos los métodos de control físico aplicados en los últimos años para la eliminación de cianobacterias en cuerpos de agua. Se han aplicado métodos de control mecánico que incluyen tanto la retirada directa de las cianobacterias, como el control de su crecimiento por inhibición de luz solar.

Se ha intentado, mediante bombas y rotores, generar la agitación del cuerpo de agua, esto provoca que se genere una mezcla en la masa de agua, evitando que las cianobacterias se estabilicen en la superficie y provocando la reducción del crecimiento por inhibición de luz. Este método presenta la limitante de depender de las características de la masa de agua. Por contraposición, se ha intentado la flotación con aire que también provoca la aglomeración. Asimismo, la aplicación de radiación UV directamente sobre el agua también ha sido ensayada. Sin embargo, esta metodología presenta un elevado coste y una efectividad baja, ya que controlan la floración en un corto periodo de tiempo, así como es poco específico, pues afecta a la totalidad del fitoplancton y puede generar efectos en el resto de la biota acuática por liberación de toxina intracelular.

Métodos de remoción químicos

Los métodos de control basados en técnicas de tipo químico producen un efecto directo. Ejemplo de ello es el ozono (Rositano y col., 1998) y diferentes pesticidas y alguicidas. La sustancia alguicida más utilizada es el sulfato de cobre, aunque se ha demostrado que las cianobacterias pueden desarrollar resistencia al cobre. En general, no

se controla la persistencia en el medio de estas sustancias, son inespecíficas y pueden producir daños por bioacumulación o biomagnificación en otros organismos. Más recientemente se han estudiado los efectos selectivos en las cianobacterias del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en disolución o en su forma sólida, dependiendo, de la especie, la capacidad de formar colonias y la intensidad de la luz (Drábková y col., 2007; Barrington y col., 2011).

Métodos de remoción biológicos

Si bien la remoción química y física ha sido muy bien investigada, recientemente ha cobrado gran importancia el estudio de la remoción por métodos biológicos. Entre estos estudios se encuentra la lisis de *M. aeruginosa* por bacterias asociadas al florecimiento, este es un tema de gran interés en el campo del control biológico como alternativa amigable con el ambiente. Algunos estudios han indicado que ciertas cepas bacterianas aisladas e identificadas como especies de *Sphingomonas* provenientes de drenaje de agua de riego participaban en la degradación de MCs. Nuestro grupo de trabajo ha logrado aislar e identificar una bacteria que degrada MCs y su secuenciación ha sido depositada en el banco de datos genéricos correspondiendo a *Achromobacter xylosoxidans*. Esta bacteria ha sido aislada en un florecimiento de *M. aeruginosa* en el Río de la Plata en el año 2014 y ha demostrado reducir los niveles de MC en soluciones acuosas en un 79.5% (Crettaz Minaglia y col, 2018). El grupo de trabajo ha evaluado la capacidad de *Achromobacter xylosoxidans* de degradar MC en solución acuosa, sin embargo, no se conoce cuál será el comportamiento de la bacteria *Achromobacter xylosoxidans* en co-cultivo con *M. aeruginosa*. Siendo la temperatura uno de los factores ambientales determinante para el crecimiento de bacterias y la expresión de determinadas enzimas, es posible que un aumento de temperatura esperable en escenarios de cambio climático podría modificar

la actividad de lisis de *M. aeruginosa*. Resulta de interés evaluar la cinética de crecimiento de la bacteria *Achromobacter xylosoxidans* a diferentes temperaturas teniendo en cuenta el aumento de temperatura ambiental previsto en escenarios de cambio climático. Para ello, el modelado matemático resulta ser una importante herramienta a ser aplicada.

Modelos matemáticos

La microbiología predictiva se basa en el desarrollo de modelos matemáticos que permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales.

A efectos de modelar el crecimiento de la bacteria *Achromobacter xylosoxidans* puede utilizarse el modelo de Gompertz para describir su desarrollo (Zwietering y col., 1990). Este modelo determina la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores ambientales. Es una función doble exponencial basada en 4 parámetros que describen una curva sigmoideal asimétrica (Ecuación 1).

$$\text{Ec. 1 } \text{Log}(N) = a + c * \exp(-\exp(-b*(t - m)))$$

Donde **Log(N)** es el logaritmo decimal del recuento de colonias (Log UFC.mL^{-1}), **a** es el logaritmo del recuento asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente (equivale al logaritmo inicial del número de bacterias (N_0) expresado como $\log(\text{UFC.mL}^{-1})$), **c** es el logaritmo asintótico del conteo cuando el tiempo es aumentado indefinidamente (el número de ciclos logarítmicos de crecimiento) ($\log(\text{cél.mL}^{-1})$), **b** es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo t (horas^{-1}) y **m** es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (horas). A partir de estos parámetros, se pueden estimar los parámetros derivados de la ecuación de Gompertz que son: la velocidad específica de crecimiento (μ) que corresponde al valor

definido como la tangente en el punto de inflexión y se calcula como $\mu = b.c/e$ con $e = 2,7182$ (horas⁻¹); la duración de la fase de latencia (FL) definida como la intercepción de la tangente en el eje x y la asíntota del eje y fue calculada como $FL = m - 1/b$ (horas); y la máxima población (MPD) como el valor máximo de células alcanzado y se calcula como $MPD = a + c$ (log (UFC.mL⁻¹))

Objetivos

- Estudiar la cinética de crecimiento de *Achromobacter xylosoxidans* a tres temperaturas en el rango esperado en escenarios de cambio climático.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la capacidad de lisar células toxicogénicas de *M. aeruginosa* por parte *Achromobacter xylosoxidans*, microorganismo autóctono aislado de un florecimiento en el Río de la Plata.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas: La cepa utilizada de *Achromobacter xylosoxidans* fue aislada de un florecimiento de *M. aeruginosa* del Río de la Plata, en trabajos previos realizados por el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP. La cepa de *Microcystis aeruginosa* utilizada en este trabajo corresponde a la cepa CAAT-003 del cepario de cianobacterias con el que cuenta el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. La cepa de *Microcystis aeruginosa* fue obtenida de un florecimiento en la localidad de Pila, Provincia de Buenos Aires. La misma se replica periódicamente y mantiene en cultivo en medio BG11.

Cinética de crecimiento de *Achromobacter xylosoxidans* a tres temperaturas. A efectos de evaluar la mejor temperatura de creci-

miento de la bacteria *Achromobacter xylosoxidans* se evaluó la cinética de crecimiento a tres temperaturas (28, 32 y 36°C).

Obtención del inóculo. Se tomó 1 ml del cultivo de la bacteria crecida por 12 horas en Caldo Nutritivo estimando un inóculo en 10^9 UFC/ml. Luego se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de Caldo Nutritivo. La suspensión resultante se homogeneizó en Vortex y se le realizaron diluciones seriadas en Agua Peptona hasta llegar a un inóculo final estimado de 10^5 UFC.ml⁻¹.

Incubación del inóculo a tres temperaturas. El inóculo recién preparado, se fraccionó en tres volúmenes de 10 ml cada uno y se incubó cada uno en estufa a tres temperaturas controladas de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ o $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Para evaluar la cinética de crecimiento de *Achromobacter xylosoxidans*, se tomó 1 ml de cada cultivo cada 2 a 4 horas hasta 19 horas de máximo a fin de realizar el conteo en placa de Petri empleando el medio de cultivo Plate Count Agar por duplicado. Se empleó el método de plaqueo en profundidad para luego realizar la incubación a 37°C durante 48 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC.ml⁻¹).

Lectura de absorbancia. Se tomó 1 ml de suspensión incubada en estufa a 28°C, 32°C o 36°C cada 2 a 4 horas hasta un máximo de 19 horas con el objetivo de medir absorbancia a 600 nm.

Detección de la actividad cianocida de *Achromobacter xylosoxidans* en co-cultivo con *Micocystis aeruginosa* a tres temperaturas

Condiciones de cultivo. La cepa *A. xylosoxidans* se inoculó en caldo nutritivo y se incubó durante 12hs a tres temperaturas 28°C, 32°C y 36°C. Luego el cultivo crecido se cosechó por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 min, ajustando la OD 660 a 1.0 con medio fresco BG11.

Co-cultivo. La capacidad de lisis de *A. xylosoxidans* se realizó mediante su inoculación en cultivos líquido de una cepa toxicogénica *M. aeruginosa* CAAT-003.

Co-cultivo en medio BG11. Para ello, 1 ml de suspensión de *A. xylosoxidans* conteniendo aproximadamente 8×10^7 UFC/ml se inoculó en erlenmeyers conteniendo 19 ml de cultivo de *M. aeruginosa* (10^5 células mL^{-1}). El cultivo de partida de *M. aeruginosa* se obtuvo a partir de agregar 10 ml de medio BG11 a 10 ml de cultivo 2×10^5 células. mL^{-1} . Los co-cultivos se incubaron por 7 días a 28°C, 32°C y 36° C en cámara de temperatura controlada (Ingelab I-292PF) con intensidad de irradiación de 30 μ mmol fotones. $m^2.s^{-1}$ y fotoperíodo de luz oscuridad 14/10 hs respectivamente.

Para complementar se realizó un ensayo control en las mismas condiciones en ausencia de *A. xylosoxidans*. Al inicio y a los 7 días de incubación se tomaron alícuotas del cultivo, se midió el pH, el contenido de clorofila (clo-a) y se calculó el porcentaje de lisis celular de *M. aeruginosa*. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Co-cultivo en agua del Río de la Plata. En este caso se intentó simular las condiciones normales de crecimiento de *A. xylosoxidans* y *M. aeruginosa*. Para ello, 1 ml de suspensión de *A. xylosoxidans* conteniendo aproximadamente 8×10^7 UFC/ml se inoculó en erlenmeyers conteniendo 20 ml de cultivo de *M. aeruginosa* (10^5 células mL^{-1}). Este cultivo se obtuvo a partir de agregar 10 ml de agua del Río de la Plata a 10 ml de cultivo de *M. aeruginosa* conteniendo aproximadamente 10^5 células mL^{-1} . Los co-cultivos se incubaron por 7 días a 36° C en cámara de temperatura controlada (Ingelab I-292PF) con intensidad de irradiación de 30 μ mmol fotones. $m^2.s^{-1}$ y fotoperíodo de luz oscuridad 14/10 hs respectivamente. Asimismo, se realizó un ensayo control en las mismas condiciones en ausencia de *A. xylosoxidans*. Al inicio y a los 7 días de incubación se tomaron alícuotas de los mismos a efectos de evaluar el pH, el contenido de clo-a y se calculó el porcentaje de lisis celular de *M. aeruginosa*. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Determinación de pH. Se determinó el pH de los co-cultivos de *M. aeruginosa* y *A. xylosoxidans*, al inicio y a los 3 y 7 días a las tres temperaturas empleando un pHmetro Sper Scientific Water Quality Meter Model 850081.

Determinación de clorofila (clo-a). Se llevó a cabo según el método de Marker (1980): se tomó 1 ml del cultivo de *M. aeruginosa*, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y al pellet se le añadió 1 ml de metanol. Se dejó en extracción, durante una noche, en oscuridad. Una vez finalizada la extracción se tomó el extracto y se lo colocó en una cubeta de 1 cm de camino óptico y se leyó la absorbancia a 750 y 665 nm. En la misma cubeta se agregó 1 gota de HCl 1 N y luego de 1 minuto se repitió la lectura a ambas longitudes de onda empleando un espectrofotómetro Hitachi U 1900 con cubetas de 1 cm de camino óptico. Con el fin de corregir el valor de clo-a, se restaron los valores de absorbancia de los feopigmentos que interfieren en la determinación.

Determinación de porcentaje de lisis. La actividad lítica (AL) a los 7 días de cultivo fue calculada con la Ecuación 2 (Zhang y col., 2011).

$$\text{Ec. 2} \quad AL(\%) = \left(1 - \frac{T_t}{C_t}\right) \times 100 \quad AL(\%) = \left(1 - \frac{T_t}{C_t}\right) \times 100$$

Donde:

T_t T_t corresponde a la concentración de clo-a a obtenida a partir del co-cultivo de *M. aeruginosa* CAAT-003 tratada con *A. xylosoxidans*, a los 7 días. C_t C_t corresponde a la concentración de clo-a a obtenida a los 7 días de cultivo control de *M. aeruginosa* CAAT-003.

También se calculó la fracción remanente de clo-a (F_r) para cada tratamiento y fueron comparados entre sí, aplicando la Ecuación 3:

$$\text{Ec. 3} \quad Fr = \frac{\text{Clorofila}_{7 \text{ dias}}}{\text{Clorofila}_{\text{inicial}}} \quad Fr = \frac{\text{Clorofila}_{7 \text{ dias}}}{\text{Clorofila}_{\text{inicial}}}$$

Análisis estadístico. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Achromobacter xylosoxidans* y sobre la lisis de *M. aeruginosa*, se evaluaron mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) con un nivel de significación $p < 0,05$. El ajuste de los resultados experimentales al modelo matemático de Gompertz se realizó empleando el software SigmaPlot 12. El programa arroja los parámetros a, b, m y c así como el coeficiente de correlación (R^2) que indica el grado de ajuste de los resultados experimentales al modelo propuesto.

Resultados y Discusión

Cinética de crecimiento de *Achromobacter xylosoxidans* a tres temperaturas. Se evaluó la cinética de crecimiento de la cepa *Achromobacter xylosoxidans* en caldo nutritivo incubada a tres temperaturas 28°C, 32°C y 36°C mediante el recuento en placa y la medida de la absorbancia a 600 nm. La Figura 101 presenta la cinética de crecimiento de *A. xylosoxidans* donde los puntos corresponden a los valores experimentales de los recuentos en placa y las líneas corresponden a la aplicación del modelo matemático de Gompertz. Se observó diferencia significativa en el crecimiento de *A. xylosoxidans* a las distintas temperaturas de cultivo 28°C, 32°C, 38°C ($p < 0,05$). También se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) según el tiempo y la interacción tiempo -temperatura. Pude observarse en la figura que la fase de latencia del microorganismo a 36°C fue la menor respecto a la de los otros 2 tratamientos. El cultivo a 36°C se mantuvo con valores de recuentos mayores en el tiempo, seguido del cultivo a 32°C y por último el de 28°C. Al cabo de 16 horas los cultivos se encontraron en fase estacionaria igualándose el de 32°C y 36°C. La aplicación del

modelado permite obtener los parámetros cinéticos de crecimiento de *A. xylosoxidans*, siendo estos la fase de latencia (FL), velocidad específica de crecimiento (μ) y máxima densidad poblacional (MDP). En la Tabla 1 se presentan los parámetros del modelo de Gompertz (c, b, m y a) y los derivados μ , FL y MPD.

El modelado de Gompertz arrojó valores de R^2 superiores a 0.985 para los tres tratamientos, indicando que los resultados experimentales se ajustan bien a los predichos por el modelo matemático. Se observó que a medida que la temperatura aumentaba, la velocidad específica de crecimiento también lo hizo, notándose diferencias significativas entre 28°C y 32°C, 28°C y 36°C, pero no entre 32°C y 36°C. Asimismo la fase de latencia disminuyó con el aumento de temperatura, siendo significativa la diferencia al comparar los tratamientos de 28°C y 36°C, 32°C y 36°C pero no entre 28°C y 32°C. Finalmente analizando la máxima densidad poblacional se observó que no existían diferencia significativa entre los tres tratamientos.

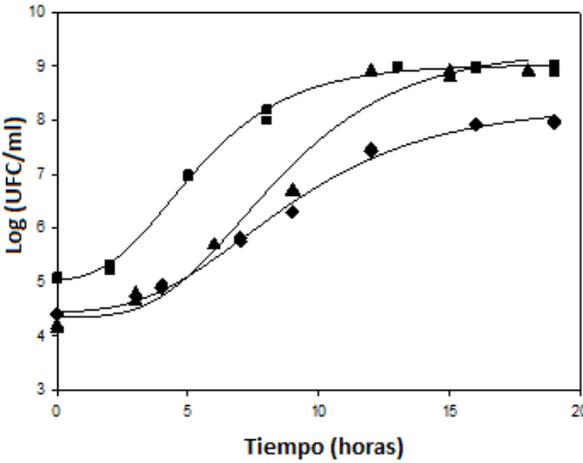


Figura 101. Cinética de crecimiento de *A. xylosoxidans* a 28°C, 32°C y 36°C

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos por modelado matemático de Gompertz

| Temperatura | c | b | m | a | μ (h ⁻¹) | FL (h) | MDP (UFC. mL ⁻¹) | R ² |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|------------------------|------------------------------|----------------|
| 28 °C | 3,81±0,19 | 0,25±0,03 | 7,81±0,26 | 5,02±0,12 | 0,35±0,06 ^a | 3,81±0,74 ^b | 8,83±0,31 ^a | 0,999 |
| 32°C | 4,95±0,37 | 0,30±0,05 | 7,07±0,43 | 4,35±0,24 | 0,55±0,17 ^b | 3,72±0,98 ^b | 9,30±0,61 ^a | 0,985 |
| 36°C | 3,99±0,10 | 0,40±0,05 | 4,31±0,16 | 5,03±0,07 | 0,59±0,11 ^b | 1,81±0,47 ^a | 9,02±0,17 ^a | 0,997 |

Figura 102. Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas en los parámetros ($p < 0,001$)

Correlación de la Absorbancia con el recuento en placa de *A. xylosoxidans* a diferentes temperaturas. En la figura 103 se puede observar la relación lineal que existe entre la absorbancia y el log (N) de *A. xylosoxidans*. Los coeficientes de determinación (R²) obtenidos en la regresión lineal fueron de 0,951, 0,944 y 0,831 para las temperaturas 28°C, 32°C y 36°C respectivamente.

Detección de la actividad cianocida de *A. xylosoxidans* en co-cultivo con *M. aeruginosa* a tres temperaturas. Otro ensayo de interesante análisis es la actividad cianocida de *A. xylosoxidans* sobre la cepa de *M. aeruginosa* en co-cultivo. La actividad lítica de *A. xylosoxidans* se observó indirectamente midiendo la concentración de clo-a en el medio de cultivo. Para ello, se estudió las variaciones de clo-a a los 3 y 7 días de co-cultivo a tres temperaturas (28, 32 y 36°C).

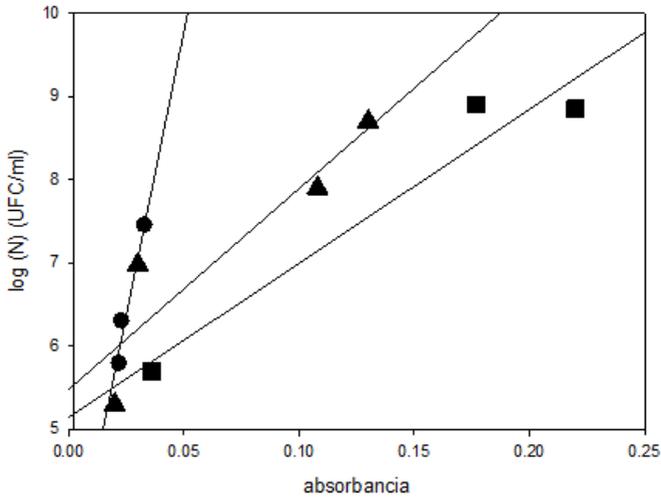


Figura 103: Correlación lineal entre la Absorbancia y el log del número de *A. xylosoxidans*, ◆ 28°C, ▲ 32°C y ■ 36°C.

Co-Cultivo de *A. xylosoxidans* con *M. aeruginosa* en medio BG11 a 28°C, 32°C, 36°C. En la Figura 104 se presentan los valores de la concentración de Clo-a y el tiempo de cultivo, tanto para el cultivo control de *M. aeruginosa* como para el co-cultivo de *M. aeruginosa* y *A. xylosoxidans* a las tres temperaturas ensayadas 28°C, 32°C y 36°C. Puede observarse que la concentración de Clo-a disminuye cuando *M. aeruginosa* es co-cultivada con *A. xylosoxidans* a las tres temperaturas ensayadas. Sin embargo, esto no se observa en el cultivo control de *M. aeruginosa* por lo que se puede afirmar que *A. xylosoxidans* es capaz de lisar a *M. aeruginosa*. De esta manera la clo-a que es liberada al medio luego de la lisis celular es degradada por *A. xylosoxidans* lo cual conduce a la disminución de la concentración de Clo-a en el medio de cultivo.

No se observaron diferencias significativas en la concentración final de clo-a a los 7 días en cultivo control de *M. aeruginosa* a las tres temperaturas ($p > 0,05$). La concentración de clo-a a los 7 días de

co-cultivo de *M. aeruginosa* con *A. xylosoxidans* presentó diferencias estadísticamente significativas dependiendo de la temperatura del cultivo ($p < 0,05$). También se cuantificó la fracción remanente de Clo-a (**Fr**) para el co-cultivo a las tres temperaturas ensayadas (Ecuación 3, Tabla 2).

Los resultados expuestos demuestran que la fracción remanente de clo-a (**Fr**) disminuyó con el aumento de la temperatura. Es decir, que conforme aumenta la temperatura, la concentración de clo-a los 7 días de co-cultivo, respecto a la concentración inicial, tiende a valores más bajos lo cual indica su degradación. Asimismo, el pH de los cultivos se mantuvo estable en el rango de 8,0 a 8,5. Se cuantificó la actividad lítica (**AL**) de *A. xylosoxidans* sobre *M. aeruginosa* a los 7 días a las 3 temperaturas ensayadas (Ecuación 2) siendo de $25,3 \pm 2,2\%$; $43,0 \pm 2,0\%$ y $48,3 \pm 5,5\%$ a los 28, 32 y 36°C respectivamente. Por lo anterior, podemos afirmar que el porcentaje de lisis de *M. aeruginosa* en presencia de *A. xylosoxidans* aumenta conforme aumenta la temperatura del co-cultivo.

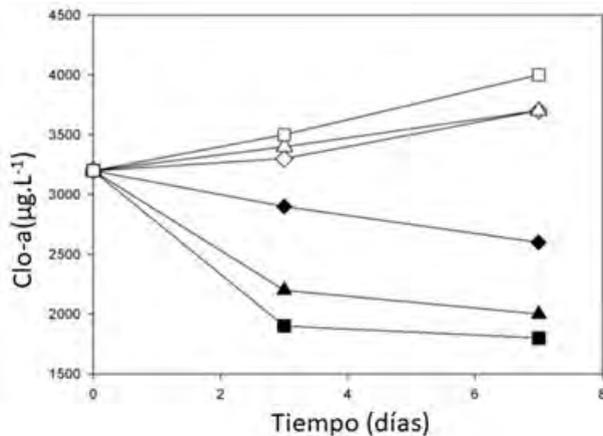


Figura 104. Variación de la concentración de Clorofila-a en el tiempo. Cultivo de *M. aeruginosa* (control) a tres temperaturas, 28°C , 32°C y 36°C , Co-cultivo de *M. aeruginosa* y *A. xylosoxidans* a tres temperaturas 28°C , 32°C y 36°C

| Temperatura | Concentración promedio de Clo-a inicial ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Concentración promedio de Clo-a a los 7 días ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Fr |
|-------------|--|---|------|
| 28°C | 3269 | 2622 | 0,80 |
| 32°C | 3269 | 2054 | 0,63 |
| 36°C | 3269 | 1801 | 0,55 |

Figura 105. Fracción remanente de clorofila-a a diferentes temperaturas

Si bien en el presente trabajo no se realizaron ensayos que permitan proponer el mecanismo a través del cual *A. xylooxidans* es capaz de lisar a *M. aeruginosa*, otros autores han publicado sus estudios acerca de la actividad lítica de distintas especies bacterianas sobre *M. aeruginosa*. Nakamura y col., (2003) propuso que a pH alcalino y a temperaturas que entre 25-30 °C *Bacillus cereus* N-14 posee el mayor rendimiento lítico sobre *M. aeruginosa*, estudio profundizado por Su y col., (2016) quien indicó que la temperatura óptima a la que *Acinetobacter sp. J25* produce la lisis de *M. aeruginosa* es 30,5°C. Coincidiendo con lo observado en el presente trabajo para *A. xylooxidans*, Daft y col (1975) y De Leon y col., (2002) concluyeron que estas condiciones de altas temperaturas y pH alcalinos son las más adecuadas para realizar ensayos de co-cultivos de *M. aeruginosa*, al ser las más cercanas a las condiciones naturales ambientales de desarrollo de estas bacterias.

Para la realización de este trabajo se tuvieron en cuenta estas investigaciones previas, de esta manera se estableció que el rango de temperatura en el cual se realizarían los ensayos sería de 28°C a 36°C y el rango de pH 8,0 a 8,5 con el objetivo de obtener la mayor actividad lítica de *A. xylooxidans*.

Por otra parte, otros trabajos expusieron la actividad dual de algunas especies de bacterias que no sólo producen lisis de *M. aeruginosa*, sino

que también son capaces de degradar MCs como *Pseudomonas* (Zhao y col., 2005) y *Acinetobacter* (Li y col., 2016). Estas especies bacterianas poseen una mayor capacidad lítica sobre *M. aeruginosa* respecto a la observada para *A. xylosoxidans*. Lee y col., (2010) y Yang y col., (2013) propusieron que otras bacterias producen sustancias alguicidas que se liberan al medio extracelular generando degradación de la pared celular de *M. aeruginosa*, mientras que Daft y col., (1975) propuso que para que se genere la lisis es necesario el contacto célula-célula.

Co-Cultivo de *A. xylosoxidans* con *M. aeruginosa* en agua de Río de la Plata a 36°C. Seguidamente se evaluó la actividad cianocida de *A. xylosoxidans* en agua del Río de la Plata conteniendo *M. aeruginosa*. Este ensayo se evaluó sólo a 36°C dado que corresponde a la temperatura que produce la mayor actividad lítica en co-cultivo con *M. aeruginosa*. En la Figura 106 se presentan los resultados obtenidos de clo-a en co-cultivo de *A. xylosoxidans* con *M. aeruginosa* en agua de Río de la Plata.

| Tiempo | <i>M. aeruginosa</i> cultivada en agua del Río de la Plata | | <i>M. aeruginosa</i> co-cultivada con <i>A. xylosoxidans</i> en agua del Río de la Plata | |
|--------|--|-----|--|-----|
| | Clo-a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | pH | Clo-a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | pH |
| 0 días | 3444 | 8,2 | 3444 | 8,2 |
| 7 días | 4140 | 8,5 | 2740 | 8,4 |

Figura 106. Valores de clorofila-a en co-cultivo de *A. xylosoxidans* con *M. aeruginosa* en agua de Río de la Plata

Se observó que en el control se produjo un aumento en la concentración de clo-a a los 7 días, mientras que en el co-cultivo a 36°C

hubo una disminución de la concentración de clo-a luego de 7 días por acción lítica de *A. xylosoxidans* sobre *M. aeruginosa* y posterior degradación de clo-a en el medio. Esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El co-cultivo en agua de Río de La Plata siguió el mismo comportamiento que el co-cultivo en medio BG11. El porcentaje de actividad lítica (AL) de *A. xylosoxidans* luego de los 7 días de co-cultivo fue de 34% (Ec. 2). De manera cualitativa se observó una disminución en el color verdoso característico de *M. aeruginosa* en el erlenmeyer donde se realizaron el tratamiento, Figura 107.

Conclusiones

En este trabajo se estudió la remoción biológica de *M. aeruginosa* como un método complementario de decontaminación del agua de consumo. *A. xylosoxidans* ha demostrado tener alta eficacia en la lisis de *M. aeruginosa*. Se demostró que el máximo crecimiento y actividad lítica de *A. xylosoxidans* se alcanzó a 36°C, mientras que se observó el menor crecimiento y actividad lítica a 28°C indicando la influencia de la temperatura en estos procesos.

Adicionalmente, se comprobó que la cuantificación de Clo-a es una buena estrategia de monitoreo de la lisis de *M. aeruginosa*. El co-cultivo de *M. aeruginosa* y *A. xylosoxidans* demostró que esta última no sólo tiene una actividad lítica directa sobre *M. aeruginosa*, sino que también es capaz de degradar la Clo-a liberada al medio de cultivo. De forma análoga, este fenómeno fue observado también en co-cultivo en agua de río, lo que sugiere que esta interacción podría ocurrir también bajo las condiciones ambientales.



Figura 107. A la izquierda se encuentra el control, y a la derecha el erlenmeyer en el cual se realizó el tratamiento. Nótese la diferencia de color.

Bibliografía

- Barrington, D. J., Ghadouani A., Ivey G. N. (2011). “Environmental Factors and the Application of Hydrogen Peroxide for the Removal of Toxic Cyanobacteria from Waste Stabilization Ponds”. *Journal of Environmental Engineer*, 137: 952.
- Crettaz Minaglia M., Aranda O., Juárez I., Oliver C., Pezzoni M., Costa C., Sedan D., Andrinolo, Giannuzzi L. (2018). “Remoción biológica de Microcistina-LR mediante microorganismos autóctonos aislados del Río de la Plata”. *3º Congreso Interamericano de Cambio Climático*, mayo 2018, Buenos Aires.
- Daft, M. J., McCord, S. B., Stewart, W. D. P. (1975). “Ecological studies on algal-lysing bacteria in fresh waters”. *Freshwater Biology*, 5(6), 577-596.
- De León, L. (2002). “Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias”. En Dominguez,

- A., Prieto, R. G. y Achkar, M. *Perfil Ambiental del Uruguay*. Montevideo: Nordan-Comunidad, pp 28-37.
- Drábková M., Admiraal W., Marsálek B. (2007). "Combined exposure to hydrogen peroxide and light – Selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms". *Environ. Sci. Technol.* 41, 309.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., Andrinolo, D. (2011). "An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina". *Marine Drugs* 9, 2164-2175.
- Lee, Y. K., Ahn, C. Y., Kim, H. S., Oh, H. M. (2010). "Cyanobactericidal effect of *Rhodococcus* sp. isolated from eutrophic lake on *Microcystis* sp". *Biotechnology letters*, 32(11), 1673-1678.
- Li, H., Ai, H., Kang, L., Sun, X., He, Q. (2016). "Simultaneous *Microcystis* algicidal and Microcystin degrading capability by a single *Acinetobacter* bacterial strain". *Environmental science & technology*, 50(21), 11903-11911.
- Marker, A.F.H., Crowther, C.A., Gunn, R.J.M., (1980). "Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry". *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14, 52-69.
- Nakamura, N., Nakano, K., Sugiura, N., Matsumura, M. (2003). "A novel cyanobacteriolytic bacterium, *Bacillus cereus*, isolated from a eutrophic lake". *Journal of bioscience and bioengineering*, 95(2), 179-184.
- Rositano, J., Nicholson, B.C., Pieronne, P. (1998). "Destruction of cyanobacterial toxins by ozone". *Ozone Sci. Eng.* 20, 223.
- Su, F.J., Ma, M., Wei, L., Ma, F., suo Lu, J., & cheng Shao, S. (2016). "Algicidal and denitrification characterization of *Acinetobacter* sp. J25 against *Microcystis aeruginosa* and microbial community in eutrophic landscape water". *Marine pollution bulletin*, 107(1), 233-239.

- USEPA, 2001. "Creating a cyanotoxin target list for the unregulated contaminant monitoring rule". *United States Environmental Protection Agency Meeting*, Cincinnati, USA.
- World Health Organization (WHO) (2010). "Safe levels and safe practices" en *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Suffolk: St. Edmundsbury Press. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxycyanchap5.pdf
- Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F. *et al.* (1990). "Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity". *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116, 609-614.
- Yang, F., Li, X., Li, Y., Wei, H., Yu, G., Yin, L., & Pu, Y. (2013). "Lysing activity of an indigenous algicidal bacterium *Aeromonas* sp. against *Microcystis* spp. isolated from Lake Taihu". *Environmental technology*, 34(11), 1421-1427.
- Zhao, C. P., Pu, Y. P., Yin, L. H., Lu, X. W., & Li, X. N. (2005). "Isolation and algicidal effect of a lytic *Microcystis* bacterium from Taihu Lake". *Journal of Southeast University*, 35(4), 602-605.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van't Riet, K. (1990). "Modeling of the bacterial growth curve". *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1875-1881.