

## INCIDENCIA Y CARACTERISTICAS METABOLICAS DE BACTERIAS DE SUPERFICIE HIDROFOBICA PRESENTES EN EL NEUSTON DE POZAS LITORALES

Yenise Soto, James Robeson y Patricio García-Tello\*

**ABSTRACT.** Incidence and metabolic traits of bacteria with hydrophobic surface present in the neuston of littoral pools.

The incidence of bacteria showing surface hydrophobicity in the neustonic layer of littoral pools as compared with their incidence in subsurface water was determined. In addition, some of their metabolic traits were examined. A greater incidence of bacteria with hydrophobic surface in the neustonic layer was consistently found. The isolates examined belong to the genera *Vibrio* and *Pseudomonas* and could use various sugars, organic polymers and aromatic compounds as sole source of carbon and energy. The results suggest a selection of a bacterioneuston adapted to the features of its habitat.

**Key words:** Bacterioneuston, hydrophobicity, littoral pools.

### INTRODUCCION

El término neuston es aplicado a plantas, animales y bacterias que están asociadas con la película superficial del agua (ZoBell 1946); es, sin duda, el neuston, uno de los hábitats menos estudiados en ecología microbiana marina, a pesar de ser de gran interés microbiológico, debido a que en esta película se acumulan sustancias orgánicas simples y poliméricas, muchas de naturaleza altamente hidrofóbica (Parker & Barsom 1970, Duce et al. 1972) aportadas por la comunidad neustónica, nectónica y bentónica, como también de origen alóctono, tales como lípidos e hidrocarburos. Por otra parte, una apreciable

\* Instituto de Biología, Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4059, Valparaíso, Chile.

proporción del carbono orgánico disuelto acumulado en la película superficial corresponde a carbohidratos de origen fitoplanctónico (Sieburth et al. 1976), además de materiales fenólicos, complejos carbohidrato-proteico y lípidos (Carlson & Mayer 1980). La presencia de estos componentes en la microcapa superficial, posiblemente ejercen una cierta selección sobre el bacterioneuston, una de cuyas características sería la abundancia de bacterias de superficie hidrofóbica.

El objetivo de este trabajo es conocer la incidencia de bacterias de superficie hidrofóbica en el neuston y su comportamiento frente a compuestos orgánicos.

Para este estudio se escogieron pozas litorales debido a que presentan una mayor estabilidad en la masa de agua y, por consiguiente, en la capa neustónica, además de limitar el proceso de dilución de la materia orgánica aportada por la comunidad presente, lo cual tendería a enriquecer una comunidad microbiana particular.

#### MATERIALES Y METODOS

Se realizaron 14 muestreos entre el 22 de julio y el 13 de septiembre (invierno) de 1983, en las pozas rocosas de Montemar, bahía de Valparaíso (32°57'S, 71°33'W). En cada muestreo se escogieron 3 pozas a las cuales se les midió el pH y la temperatura de sus aguas.

Para la extracción de muestras de neuston se utilizó una malla de nylon de un tamiz de 18 mesh (18 hebras/pulgada), según Garrett (1965), en un marco de 40 x 40 cm. La malla se sumerge verticalmente en la poza y se retira horizontalmente, extrayendo por tensión superficial la capa superior del agua, del orden de 100 a 150  $\mu\text{m}$  (Duce et al. 1972). El agua retenida por la malla se deja escurrir por uno de sus ángulos sobre un embudo comunicado con una botella, ambos estériles (Fig. 1). El agua subsuperficial se colecta a 20 cm de profundidad con botellas estériles, las que una vez sumergidas, se destapan y se deja entrar el agua, evitando así la mezcla en la muestra con la capa neustónica.

De cada muestra se observó al microscopio óptico el sedimento de 5 ml, centrifugado por 10 minutos a 2867 g (Jouan,

E-70), con el fin de relacionar el bacterioneuston con la presencia de otros microorganismos. Por cada poza, se tomaron alícuotas de 0,1 ml de muestras de neuston y de agua subsuperficial, las que se sembraron, homogéneamente en superficie, en agar marino (0,3% extracto de levadura; 1,0% proteosa-peptona; 2,4% NaCl; 0,07% KCl; 0,5%  $MgCl_2 \times 6 H_2O$ ; 0,7%  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ; 2,0% Agar, pH 7,5) de Colwell et al. (1975), en triplicado. Las 6 placas sembradas por poza se incubaron por 48 horas a 18°C, temperatura adecuada para bacterias marinas. Se escogieron al azar 100 colonias de neuston y 100 colonias de agua subsuperficial, las que se sembraron por picadura en placas con el mismo medio, para detectar cepas hidrofóbicas mediante un test de hidrofobicidad, que consiste básicamente en presionar un disco de poliestireno sobre el medio sólido con colonias de 48 horas; el disco con las colonias adheridas se pone bajo un chorro de agua por 2 minutos, luego se fija por un minuto con metanol para finalmente teñir con violeta gensiana por un minuto (Rosenberg 1981). De las cepas de superficie hidrofóbica, aisladas en cultivos puros, se seleccionaron 29 cepas altamente hidrofóbicas en términos cualitativos, por reiterados ensayos del test de hidrofobicidad; éstas fueron sometidas a una serie de pruebas con el fin de caracterizarlas e identificarlas tentativamente.

Para caracterizar las cepas hidrofóbicas se ensayó:

- Tolerancia a NaCl, en caldo L, según Carlton & Brown (1981) a concentraciones de 1%, 5%, 10%, 12% y 15% de NaCl, además de una prueba con ausencia de esta sal. Se consideró crecimiento una lectura en el espectrofotómetro de 0,1 de densidad óptica, con una longitud de onda de 540 nm.
- Actividad enzimática sobre gelatina, almidón y Tween 80, en

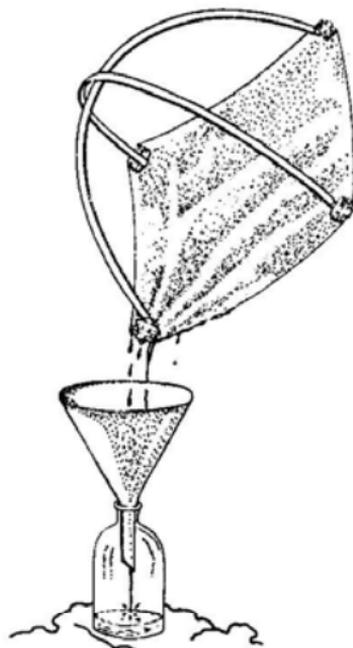


Fig. 1

Malla de Neuston tipo Garrett.

caldo L, más los compuestos mencionados a concentraciones de 0,5% según Harrigan & Mc Cance (1966).

- Utilización de azúcares simples como única fuente de carbono, en medio basal (MB), (MacLeod 1968), más 0,5% de los siguientes azúcares: inositol, lactosa, manitol, glucosa, sucrosa y rafinosa. Se determinó crecimiento por turbidez al cabo de 48 horas a 18°C.
- Utilización de compuestos aromáticos como única fuente de carbono, en MB con agar-agar al 2%. Se escogieron: p-cresol, m-clorobenzoato de sodio, fenol, naftalina y alcanfor (Merck p.a.), a concentraciones de 10 y 100 ppm. Esta prueba se hizo por picadura en placas, con un control de crecimiento, es decir, sin compuestos aromáticos, incubados a 18°C por 48 horas.

En consideración a que todas las cepas aisladas fueron Gram-negativas, la identificación tentativa se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Shewan et. al. (1960) y Smibert & Krieg (1981).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El promedio de los valores de pH determinado para diversas pozas, está dentro de un rango encontrado en aguas oceánicas, éste es, entre 7,8 y 8,2 (Riley & Chester 1971), probablemente debido a la renovación regular a que están sometidas las pozas litorales. La temperatura media del agua de las pozas litorales fue de 15°C (Fig. 2), la cual se encuentra aproximadamente 4°C por sobre la temperatura media del agua litoral, en la época de muestreo.

Los valores de recuento viable total, en agar marino, de muestras de neuston presentan un orden de magnitud de 1:100 veces más alto, que para muestras de agua subsuperficial (neuston:  $10^3 - 10^4$  UFC/ml y agua subsuperficial:  $10^2 - 10^3$  UFC/ml), datos que coinciden con las observaciones de Sieburth (1971) para aguas oceánicas. Igualmente, los resultados indican que la incidencia de bacterias de superficie hidrofóbica, fue, en todas las muestras, mayor en neuston que en agua subsuperficial. Las bacterias de superficie hidrofóbica, de origen neustónico, en 5 de 14 muestreos, superaron el 50% de las cepas aisladas al azar y como promedio de todos los muestreos alcanzaron un valor cercano al 38%. Por el contrario,

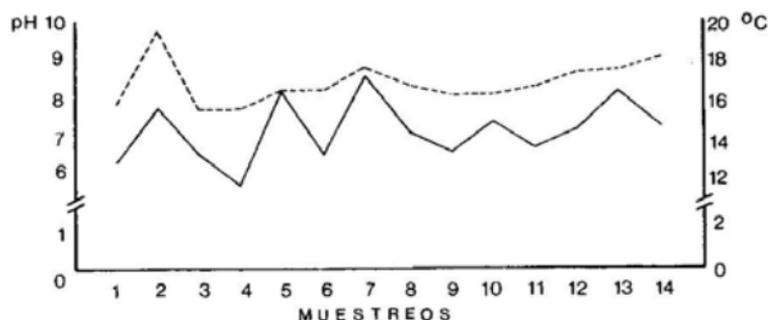


Fig. 2. Valores promedios de pH (---) y temperatura (—) de pozas litorales.

la incidencia de estas bacterias en muestras de agua subsuperficial, no superó el 20% como promedio (Fig. 3).

Se observaron requerimientos de NaCl en el 77% de las cepas hidrofóbicas. Sólo el 23% de ellas crece sin adición de esta sal al medio. Entre las bacterias que requieren adición de NaCl al medio, crecen a concentraciones entre 1% y 12%, siendo el 5% la concentración requerida por el 100% de las cepas (Fig. 4a). Aproximadamente el 50% de las cepas aisladas tiene un requerimiento que es satisfecho por 3 concentraciones distintas de NaCl (Fig. 4b). El alto nivel de tolerancia a NaCl por un gran número de cepas hidrofóbicas del bacterioneuston,

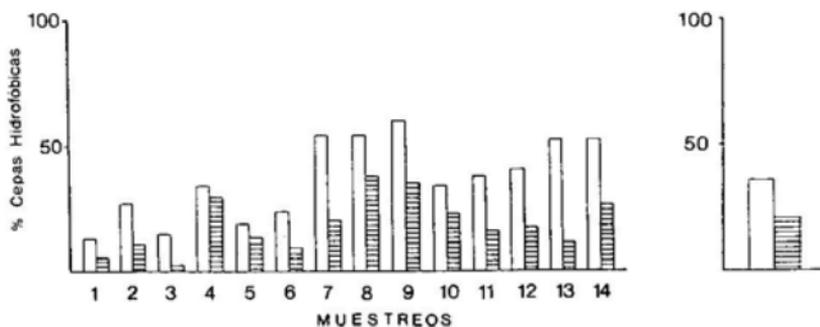


Fig. 3. Distribución de bacterias hidrofóbicas en Neuston □ y en sub-superficie ▨, en cada muestreo.

Promedio de todos los muestreos.

además de su requerimiento óptimo del 5%, sugieren que estas poblaciones están sujetas a condiciones de mayor salinidad, debido a fenómenos de evaporación y acumulación de aerosoles atmosféricos, provenientes de la superficie marina (Popov 1965). Por otra parte, Sieburth et al. (1976), señalan que la interfase agua-aire provoca la atracción de grupos hidrofóbicos. Fenómenos que en conjunto conducirían al enriquecimiento de bacterioneuston con tendencia halófila e hidrofóbica.

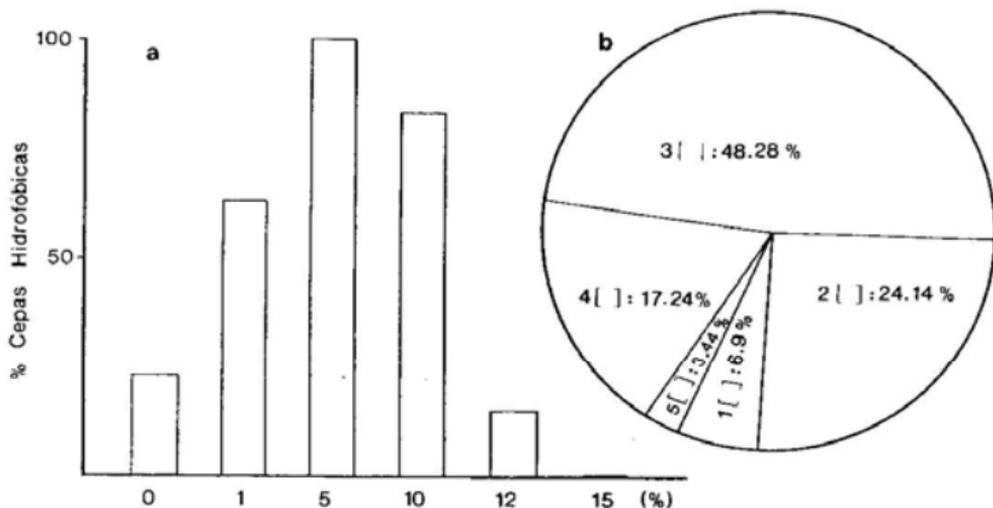


Fig. 4. (a) Crecimiento de bacterias hidrofóbicas con diferentes concentraciones ([ ]) de NaCl. (b) Rango de tolerancia de las mismas.

Un alto porcentaje de cepas son capaces de degradar gelatina, almidón y Tween 80 (Fig. 5a). Valores similares para actividad de gelatinasa y lipasa entrega Sieburth (1971), para muestras del bacterioneuston del Océano Pacífico. El valor para amilasa, se acerca más a los resultados que presenta para las aguas más templadas del Caribe y del Atlántico. Aproximadamente el 69% de las cepas actúa sobre los 3 compuestos probados (Fig. 5b).

Todos los microorganismos de superficie hidrofóbica estudiados, poseen capacidad para degradar glucosa y sucrosa como única fuente de carbono, además el 35% de ellos puede utilizar

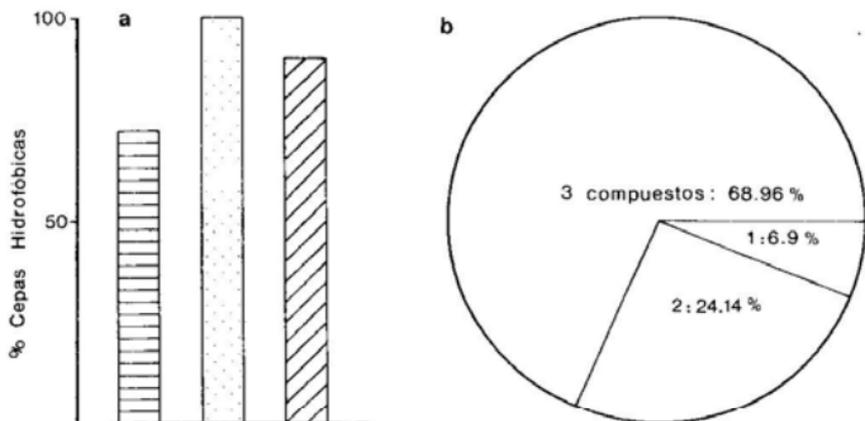


Fig. 5. (a) Utilización de Almidón, Gelatina y Tween 80. (b) Versatilidad metabólica sobre los mismos compuestos.

rafinosa y/o manitol (Fig. 6a). Con respecto a su versatilidad metabólica, el 55% de las colonias aisladas fue capaz de utilizar sólo 2 azúcares (glucosa y sucrosa) y el 45% restante, 3, 4, 5 y 6 azúcares (Fig. 6b). Valores igualmente altos entrega Sieburth (1971), para la utilización de glucosa por bacterias aisladas del neuston del Océano Pacífico (85,6%) y del Caribe y Atlántico (76%).

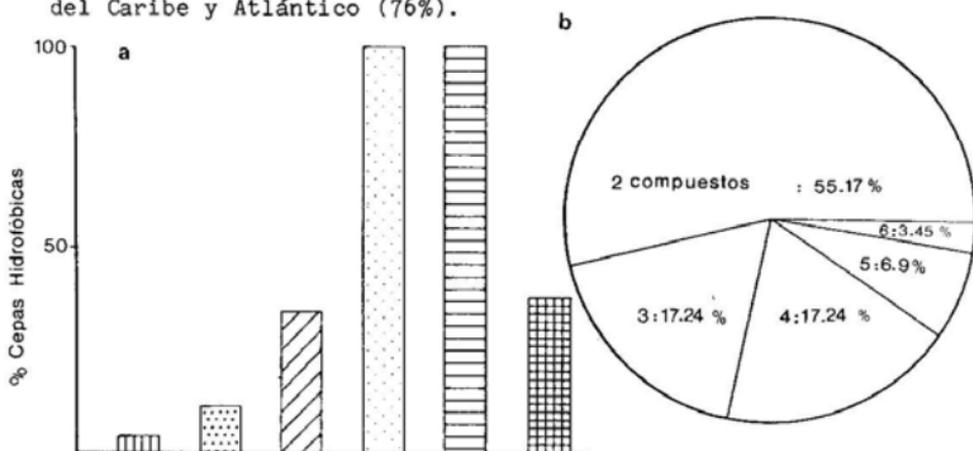


Fig. 6. (a) Utilización de azúcares simples como única fuente de carbono. Inositol, Lactosa, Manitol, Glucosa, Sucrosa y Rafinosa. (b) Versatilidad metabólica sobre los mismos azúcares.

A lo menos el 80% de las cepas, es capaz de usar como única fuente de carbono, alguno de los compuestos aromáticos probados y entre éstos, naftaleno y alcanfor fue utilizado por todas las cepas (Fig. 7a). Por otra parte, la capacidad para utilizar en forma indiferente los 5 compuestos, alcanzó a algo más del 65% de las cepas (Fig. 7b). Posiblemente, esta amplia versatilidad sea sólo parte de su actividad sobre compuestos de naturaleza hidrofóbica. Substancias relativamente hidrofóbicas son también los pesticidas o herbicidas sintéticos. Los autores Parker & Barsom (1970) expresan que la microcapa superficial del agua, sería un importante reservorio de estos compuestos.

Observaciones microscópicas del centrifugado, indicadoras de bacterioneuston abundante coincidieron con la riqueza de protozoos ciliados y de foraminíferos tecados; del mismo modo, Sieburth (1971) señala que poblaciones grandes de bacterioneuston, soportan poblaciones grandes de amebas. Al parecer, en pozas litorales como las estudiadas, la mayor actividad fotosintética recae sobre fitoflagelados pequeños, los cuales se encuentran activos y en abundancia en las muestras de neuston. Por el contrario, las diatomeas fueron escasas y la mayoría se encontraba en proceso de descomposición o con sus frústulos vacíos.

Pruebas de identificación realizadas para bacterias de

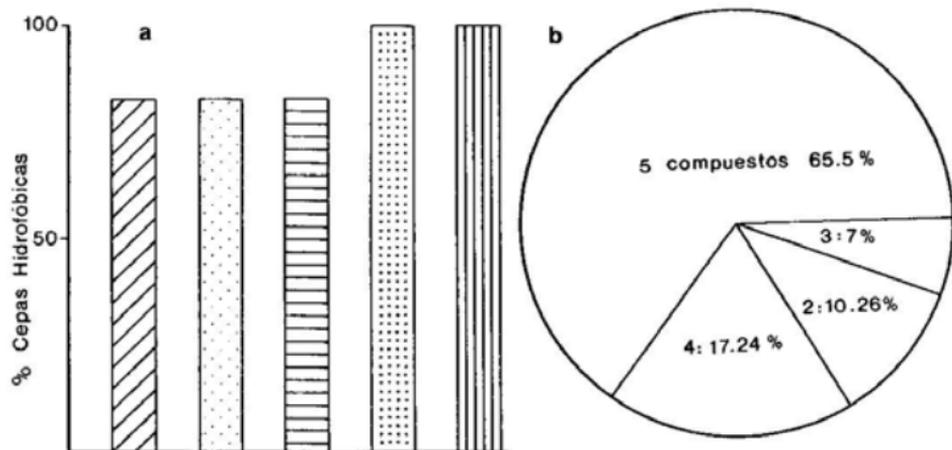


Fig. 7. (a) Utilización de compuestos aromáticos como única fuente de carbono. p-cresol , m-clorobenzoato de sodio , fenol , Naftaleno  y Alcanfor . (b) Versatilidad metabólica sobre los mismos compuestos.

superficie hidrofóbica (Tabla 1), permiten reconocer tentativamente la presencia de los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*. En igual forma, Sieburth (1971), afirma la presencia de *Pseudomonas* y enterobacterias en la capa neustónica de las aguas por él estudiadas. Como ejemplo de las reacciones conducentes a identificar como tales los géneros mencionados, podemos citar la cepa 7 para *Vibrio* y la cepa 11 para *Pseudomonas*.

### CONCLUSIONES

El estudio de las bacterias de superficie hidrofóbica de las pozas litorales, sugiere la presencia de una población bacteriana que respondería a ciertas características de este hábitat, reflejada en la abundancia de bacterias hidrofóbicas y halófilas de versatilidad metabólica amplia frente a compuestos de diversa complejidad.

### LITERATURA CITADA

- Carlson, D.J. & L.M. Mayer. 1980. Enrichment of dissolved phenolic material in the surface microlayer of coastal waters. *Nature*, 286: 482-483.
- Carlton, B.C. & B.J. Brown. 1981. Gene mutation. In: *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington.
- Colwell, R.R.; Sizemore, K.; Carney, J.F.; Morita, R.Y.; Neslon, J.D.; Pickar, J.H.; Schwarz, J.R.; Van Vilkenberg, S.D.; Walker, J.D. & R.T. Whight. 1975. *Marine and Estuarine Microbiology Laboratory Manual*, 80 p. University Park Press, Baltimore, M.D.
- Duce, R.A.; Quinn, J.G.; Olney, C.E.; Piotrowicz, B.R.; Ray, B.J. & T.L. Wade. 1972. Enrichment of heavy metals and organic compounds in the surface microlayer of Narragansett Bay, Rhode Island. *Science*, 176: 161-163.
- Garret, W. 1965. Collection of slick-forming materials from the sea surface. *Limnology and Oceanography*, 10: 602-605.
- Harrigan, W.F. & M.E. Mc Cance. 1966. *Laboratory methods in Microbiology*, 200 p. Academic Press, London, New York.

- MacLeod, R.A. 1968. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. *Advances in Microbiology of the Sea*, 1: 95-126.
- Parker, B. & G. Barsom. 1970. Biological and chemical significance of surface microlayers in aquatic ecosystems. *Bioscience*, 20: 87-93.
- Popov, N.I. 1965. Accumulation of atmospheric aerosols by sea surface. In: *Isótopos radioactivos en la atmósfera*, 373 p. Moscú. Atomizdat 1965. Citado por Zaitsev, Yu. P. 1970. *Marine Neustology*. Academy of Science of the Ukrainian SSR. Kovalevskii, Institute of the Biology of the Southern Seas, Odessa Division. Traducción al inglés. Jerusalem 1971, Keter Press.
- Riley, J.P. & R. Chester. 1971. *Introduction to Marine Chemistry*, 126 p. Academic Press. London and New York.
- Rosenberg, M. 1981. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 375-377.
- Shewan, J.M.; Hobbs, G. & W. Hodgkiss. 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. *Journal of Bacteriology*, 23: 379-390.
- Sieburth, J. Mc N.; Willis, P.J.; Johnson, K.M.; Burney, C.M.; Lavoie, D.M.; Hinga, K.R.; Caron, D.A. & F.W. French. 1976. Dissolved organic matter and heterotrophic microneuston in the surface microlayers of the North Atlantic. *Science*, 194: 1415-1418.
- Sieburth, J. Mc N. 1971. Distribution and activity of oceanic bacteria. *Deep-Sea Research*, 18: 1111-1121.
- Smibert, R.M. & N.R. Krieg. 1981. General characterization. In: *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington.
- Zobell, C.E. 1946. *Marine Microbiology*, 25 p. The Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.

