

TAXONOMIA NUMERICA Y HABITAT DE BACTERIAS MARINAS AISLADAS DE MONTEMAR, V REGION, VALPARAISO, CHILE.

B. PRADO,¹ J. LLANOS¹, A. DEL MORAL², M. CID¹, E. MAGAÑA¹, R. DIAZ¹, P. GARCIA-TELLO¹.

B. Prado¹, J. Llanos¹, A. Del Moral², M. Cid¹, E. Magaña¹, R. Díaz¹, P. García-Tello¹: Numerical Taxonomy and Habitat of Marine Bacteria Isolated from Montemar, V Región, Valparaíso, Chile.

To determine the possible correspondence between different bacterial groups and their habitats, 123 marine strains were isolated from five different environments located in the bay of Valparaíso.

Characterization was performed on the bases of 125 phenotypic tests according to methodology described previously (Quesada *et al.*, 1987; Marquez *et al.*, 1987) and including morphological, physiological, biochemical, nutritional and antibiotic susceptibility tests. Results were subjected to numerical analysis using the similarity coefficient of Sokal and Michener (1958) and the UPGMA grouping technique. The numerical analysis yielded 8 phenons differentiated at a 70% similarity level and in correspondence with the various habitats from which the microorganisms were isolated, avoiding a mixture of habitat and origin of each microorganism.

The majority of isolate were assigned to the genus *Pseudomonas* (3 phenons) and *Deleya* (3 phenons). The rest were included in the genera *Vibrio* (1 phenon) and *Flavobacterium* (1 phenon).

Key words: Marine bacteria, taxonomy, habitat.

1: Laboratorio de Microbiología Marina. Instituto de Biología. Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas. Universidad Católica de Valparaíso. Casilla 4059, Valparaíso, Chile.

2: Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España.

INTRODUCCION

Paralelamente con el renovado interés de los últimos años en la ecología microbiana de ambientes acuáticos se hace importante la comprensión de los componentes de la flora bacteriana autóctona y sus limitaciones dentro de los habitats

naturales. Los diferentes microorganismos no sólo son importantes en términos de biomasa y actividad, sino que también en la estructura que confieren a la comunidad. Una buena aproximación a los grandes grupos que forman la estructura de las comunidades microbianas lo puede entregar un estudio de taxono-

nomía numérica, especialmente si los agrupamientos obtenidos se pueden circunscribir al habitat del cual se aislaron como una unidad.

Cientoveintitrés cepas seleccionadas para el presente estudio fueron aisladas de 5 ambientes marinos ubicados en Montemar, Bahía de Valparaíso y fueron sometidas a un análisis numérico de acuerdo con Sokal & Michener (1958) y la técnica de agrupación UPGMA, (Sneath & Sokal, 1973).

Los resultados indican la presencia de ocho fenones bacterianos definidos a un nivel de semejanza de 70% y restringidos como unidades a alguno de los habitats de los cuales fueron aislados los microorganismos.

MATERIALES Y METODOS

Las 123 cepas bacterianas seleccionadas fueron aisladas de cinco ambientes marinos ubicados en Montemar, Bahía de Valparaíso, Chile, (32° 57'S; 71° 33'W), entre enero y septiembre de 1986. Las

muestras se tomaron de bacterioneuston y bacterioplancton oceánicos, bacterioneuston de pozas litorales, espuma marina y de algas (*Lessonia* spp.). La toma de muestras se hizo con técnicas estériles apropiadas. Para bacterioneuston se usó la red de Garrett (1965); para bacterioplancton una botella de 250 ml estéril con dos varillas de vidrio anexas de 1 m, una para sumergir la botella y otra para sacar y poner el tapón de vidrio esmerilado. La muestra de espuma se obtuvo con un colador de plástico estéril que permitió escurrir la muestra por un embudo a una botella estéril. Para obtener la muestra del alga se raspó su superficie con un escalpelo estéril y se pesó el raspado para ser diluido en una cantidad conocida de solución salina al 0,5%. Las muestras fueron sembradas en el laboratorio en medio de cultivo líquido, sólido o de mantenimiento según las circunstancias lo requirieron. Para aislamiento inicial se usó el medio de Colwell *et al.* (1975) y la siembra de muestras se hizo dentro de la media hora siguiente a la toma de muestras señaladas.

Como cepas de referencia se usaron las siguientes:

<i>Pseudomonas doudoroffii</i>	NCMB	1965
<i>Pseudomonas nautica</i>	DSM	50418
<i>Pseudomonas marina</i>	ATCC	25374
<i>Flavobacterium oceanosedimentum</i>	ATCC	31317
<i>Deleya aesta</i>	NCMB	1980
<i>Deleya venusta</i>	NCMB	1979
<i>Deleya pacifica</i>	NCMB	1977
<i>Deleya cupida</i>	ATCC	27124
<i>Alteromonas espejiana</i>	ATCC	29659
<i>Vibrio fischeri</i>	ATCC	7744

TESTS FENOTÍPICOS USADOS:

Las 123 cepas aisladas más las 10 cepas de referencia fueron estudiadas para 125 características fenotípicas, incluyendo tests morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, nutricionales, de sensibilidad frente a antibióticos, tolerancia a compuestos aromáticos y requerimiento de ciertos iones, de acuerdo con las metodologías de Quesada *et al.* (1987), Soto *et al.* (1984), y Colwell & Weibe (1970).

ANÁLISIS NUMÉRICO:

Para la realización del análisis numérico las pruebas seleccionadas fueron codificadas en forma binaria del tipo presencia ausencia. La cuantificación se realizó asignando el valor 1 a las pruebas positivas y 0 a las pruebas negativas.

El grado de semejanza entre las diferentes cepas se obtuvo mediante el uso del coeficiente de apareamiento simple Ssm y la técnica de agrupamiento UPGMA (Unweighted Paired-Group Mean Average) o Acoplamiento Promedio Binario Contrapesado. El test de error fue obtenido al examinar 23 cepas por duplicado (aproximadamente el 10% de las cepas estudiadas), determinándose de esta manera la reproducibilidad del error de las pruebas fenotípicas realizadas (Sneath & Johnson, 1972).

El análisis numérico se llevó a cabo utilizando el programa MINT de Taxonomía Numérica en un ordenador Eclipse MV/10000 del Centro de Cálculo de la Universidad de Granada, España.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra el análisis numérico de las cepas estudiadas utilizando el coeficiente de Ssm y la técnica de UPGMA.

Ocho fenones conteniendo 4 o más cepas fueron definidos a un 70% de semejanza. De las 10 cepas de referencia 5 fueron agrupadas a este nivel de similitud. El valor de la correlación cofenética fue de 0,73 y el test de error estimado fue de 3,8% valor que no afecta significativamente el análisis de los agrupamientos obtenidos, (Sneath & Johnson, 1972).

DISCUSION

El análisis de taxonomía numérica nos define los ocho fenones a un nivel de semejanza del 70%. Notable es la uniformidad genérica del fenón de las cepas procedentes de la espuma, además de un nivel de semejanza alto. Las cepas corresponden a agrupamientos de *Pseudomonas*, (Fig. 1: Fenón H) género de reconocida versatilidad metabólica. La presencia en la espuma de una flora de gran versatilidad fue demostrada por Rambelarioisa *et al.* (1984), además la acumulación de esteroides y ácidos grasos en la espuma fue señalado por Matsumoto *et al.* (1985) y fenoles como también de carbohidratos y proteínas por Barlocher *et al.* (1988). La presencia del género *Flavobacterium* en las muestras de la película superficial oceánica Fig. 1: Fenón G) coincide con la observación de Seki (1982) acerca de la dominancia de formas pigmentadas en el bacterio-neuston. La pigmentación protege de fenómenos de fotooxidación (Brock *et al.*

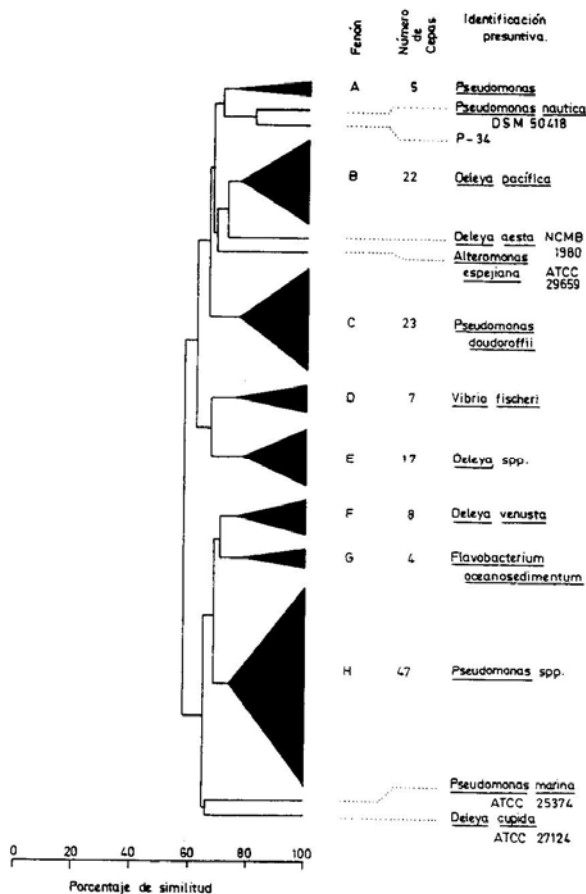


Fig.1. Dendrograma simplificado que muestra la agrupación de cepas en ocho fenómenos según el coeficiente S_{sm} y la técnica de agrupamiento UPGMA, para las 123 cepas estudiadas.

1987) y permite así el enriquecimiento de este grupo.

La presencia de una mezcla de los géneros, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Deleya*, en la película superficial de pozas, (Fig.1: Fenones A, D y F, respectivamente), indica que el desarrollo de una microflora bacteriana monogénica por enriquecimiento está enmascarado por una renovación parcial y regular de las aguas. En agua calma y apozada con mínima renovación es posible que *Vibrio* fuese favorecido por valores alcalinos del pH, además de su característico halofiliismo, (Colwell *et al.* 1975; Kobayashi *et al.* 1963).

El bacterioplancton oceánico presenta una microflora de una enorme homogeneidad en su agrupamiento con *Deleya pacifica*, cepa tipo, incluida entre 22 cepas aisladas, (Fig. 1: Fenón B).

Tsiban (1970), considera que la formación de espuma constituye un mecanismo de unión entre el bacterioplancton y el bacterioneuston y que los mismos grupos son predominantes en ambos hábitats; nuestros resultados no sustentan esta afirmación.

Las aislaciones del alga *Lessonia* spp. conforman otro grupo homogéneo, constituido por *Pseudomonas-Deleya* (Fig. 1: Fenones C y E respectivamente).

El análisis de taxonomía numérica realizado arroja la presencia de 8 grupos definidos de bacterias que ocupan con solidez los 5 ambientes de los cuales fueron aisladas. Cinco de las cepas tipo utilizadas no fueron agrupadas por el programa y cada una de las restantes son exclusivas en cuatro de los 5 hábitats estudiados. Las aislaciones de espuma no agruparon ninguna cepa tipo.

Bajo las condiciones del presente estudio, la taxonomía numérica aplicada a las poblaciones bacterianas, tiene valor como un indicador de agrupaciones microbianas de hábitats diferentes. Por otra parte, el medio de Colwell *et al.* (1975) usado en aislación inicial es un medio que como otros ejerce presión selectiva disminuyendo la diversidad microbiana detectable de los 5 ambientes diferentes, no obstante esto, fue posible revelar diferencias en la composición genérica de ambientes adyacentes.

LITERATURA CITADA

- Barlocher, F., Gordon, J. & R.J. Ireland. 1988. Organic composition of sea foam and its digestion by *Corophium volutator* (Pallas). *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **115**:179-186.
- Brock, T.D., Smith, D.W. & M.T. Madigan. 1987. *Microbiología*. Prentice Hall, Inc., México. 908 p.
- Colwell, R.R., Sizemore, R.K., Carney, J.F., Morita, R.Y., Nelson, J.D. Jr., Pickar, J.H., Schwarz, J.R., Van Valkenburg, S.D., Walker, J.D., & R.T. Wright. 1975. *Marine and estuarine microbiology laboratory manual*. University Park Press. Baltimore. 96 p.

- Colwell, R. R. & W.J. Weibe. 1970. "Core" characteristics for use in classifying aerobic, heterotrophic bacteria by numerical taxonomy. *Bull. Ga. Acad. Sci.*, 18: 165-185.
- Garret, W. D. 1965. Collection of slickforming materials from the sea surface. *Limnol. Oceanogr.*, 10:602-605.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. & S. Kuwahara. 1963. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS agar (modified Nakanishi's agar). *Jpn. J. Bacteriol.*, 18:387-391.
- Marquez, M.C., Ventosa, A. & F. Ruiz-Berraquero. 1987. A taxonomy study of heterotrophic halophilic and nonhalophilic bacteria from a salar salterns. *J. General Microbiology*, 133:45-56.
- Matsumoto, Genki F., Tetsuya, Torii & Takahisa Hanya. 1985. Sterols and fatty acids in foams from antarctic lakes of the Dry Valleys in south Victoria Land. *Geochem. J.*, 19:91-96.
- Quesada, E., Valderrama, M.J., Bejar, V., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. & A. Ramos-Cormenzana. 1987. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative nonmotile eubacteria. *System. Appl. Microbiol.*, 9:132-137.
- Rambeloarisoa, E., Rontani, J.F., Giusti, G., Duvnjak, Z. & J.C. Bertrand. 1984. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. *Mar. Biol. (Berl.)*, 83:69-82.
- Seki, H., 1982. *Organic materials in aquatic ecosystems*. CRC Press, Inc. Boca Raton. Fl.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman. San Francisco.
- Sneath, P.H.A. & R. Johnson. 1972. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological test. *J. gen. Microbiol.*, 72:377-392.
- Sokal, R.R. & C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.*, 38:1409-1438.
- Soto, Y., Robeson, J. & P. García-Tello. 1984. Incidencia y características metabólicas de bacterias de superficie hidrofóbica presentes en el neuston de pozas litorales. *Rev. Biol. Mar.*, 20:127-137.
- Tsiban, A.V. 1970. Tezisy Dokl. II Sjezda VGBO, KISHINEV, 92, (op. cit. SEKI, H. 1982).