

Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina

Identification of cultivable marine bacteria from the coastal city of Comodoro Rivadavia, Argentina

Graciela N. Pucci¹, Adrián J. Acuña¹, María L. Llanes¹,
Maria C. Tiedemann¹ y Oscar H. Pucci¹

¹Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta Pcial N° 1 km 4, Ciudad Universitaria. Comodoro Rivadavia (CP 9000), Chubut, Argentina
granapu@unpata.edu.ar

Abstract. This study identifies marine bacteria obtained from three sites along Comodoro Rivadavia coast, south of Argentina. Seawater and intertidal sediment samples were collected. Two of the sites were located close to the city sewage system (CR1, CR2) and the third one (CR3) was near from an oil buoy. Bacterial counts were performed on four culture media: BBR, BRN, mineral medium with crude oil and gas oil and ENDO for coliforms. The identification of bacteria was performed by using fatty acid methyl esters. The counts resulted positive to total coliforms and faecal coliforms in sites CR1 and CR2 and resulted negative in site CR3 except in autumn. We isolated 469 strains, to which a fatty acid extraction and identification were performed. The system identified 37 genera and 54 species in only 236 strains. The other strains were unidentified because they were not found in Sherlock data base. *Pseudoalteromonas* was the genus frequently found isolated and the enterobacteria group was conformed by *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Escherichia*. The principal components analysis related the winter season to Gram positive strain, and autumn season was associated to the biggest biodiversity of genera.

Key words: Cultivable heterotrophic bacteria, fatty acids

Resumen. Este estudio identifica bacterias marinas obtenidas de tres sitios costeros de la ciudad de Comodoro Rivadavia, sur de Argentina. Se tomaron muestras de agua de mar y sedimento del intermareal. Dos de los sitios se ubicaron cerca de desagües cloacales (CR1, CR2) y el tercero (CR3) fue cerca de una boya de carga de hidrocarburos. Se realizaron recuentos bacterianos en cuatro medios de cultivo: BBR, BRN, medio mineral con petróleo gas oil y ENDO para coliformes. Las bacterias fueron identificadas utilizando ácidos grasos metil ester. Los recuentos de coliformes totales y fecales fueron positivos en los sitios CR1 y CR2 y negativos para CR3 con excepción de la estación de otoño. Se aislaron 469 cepas a las que se les realizó la extracción de ácidos grasos e identificación. El sistema identificó 37 géneros y 54 especies en solo 236 cepas. Las restantes cepas no fueron identificadas debido a que no se encontraron en la base de datos Sherlock. *Pseudoalteromonas* fue el género que más frecuentemente se encontró aislado y el grupo de las enterobacterias estuvo integrado por *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia*. El análisis de componentes principales asoció el invierno a las cepas Gram positivas y el otoño se asoció con la mayor biodiversidad de géneros.

Palabras clave: Bacterias heterótrofas cultivables, ácidos grasos

Introducción

En ecosistemas marinos, las bacterias constituyen un componente esencial en la cadena trófica, las cuales a través de su interacción con otros seres, modifican los ambientes, y llegan a ser capaces de crecer en ambientes contaminados. En sedimentos marinos, las bacterias juegan un rol ecológico dentro del ecosistema, ya que pueden degradar compuestos contaminantes de origen orgánico (Kieft *et al.* 1997, Alexander 1999, Boschker *et al.* 2001). La capacidad de las comunidades bacterianas para biodegradar compuestos en forma natural está limitada por factores ambientales como el oxígeno molecular y los nutrientes (fosfato, amonio, nitrato, nitrito y compuestos orgánicos del nitrógeno). Sin embargo,

diversos autores han encontrado la degradación de petróleo en condiciones que no son aptas para el desarrollo bacteriano (Panicker *et al.* 2002, Margesin *et al.* 2003, Michaud *et al.* 2004).

La ciudad costera de Comodoro Rivadavia está ubicada en el centro del golfo San Jorge (45°47'S, 67°30'W), Argentina. Las playas de esta ciudad son de arenas finas y de canto rodado. Su principal actividad económica es la industria extractiva de petróleo que se desarrolla desde hace 100 años. Además, no existen refinerías, por lo que el petróleo es transportado por vía marítima. No se han producido, hasta el momento, naufragios o ruptura de tanques, pero la presencia de boyas de carga y descarga de hidrocarburos pueden

generar micro derrames. Sumado a esto, la ciudad descarga emisarios cloacales con escaso o nulo tratamiento en las aguas de la playa.

Los microorganismos coliformes totales y fecales son amplios indicadores de contaminación de origen fecal (Salas 2000), mientras que la composición bacteriana de una zona contaminada permite determinar que grupos pueden tolerar y crecer en presencia de contaminantes. Por lo tanto, el conocimiento de cómo está constituida la comunidad bacteriana del agua de mar y del sedimento en la región costera de Comodoro Rivadavia permitiría conocer el estado de contaminación antrópica de la zona y estimar que microorganismos son capaces de actuar ante la posibilidad de derrames de hidrocarburos de baja envergadura, como aquellos ocasionados por los trabajos de rutina en el transporte y descarga de esta materia.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar (i) la estructura de la población bacteriana cultivable de acuerdo al método de los ácidos grasos metil ésteres (FAME) y (ii) el potencial de biodegradación de hidrocarburos de la comunidad bacteriana presente en el sedimento intermareal y en el agua de mar de tres sitio de la costa de la ciudad de Comodoro Rivadavia en las cuatro estaciones del año.

Material y métodos

Obtención de muestras

Se tomaron muestras puntuales de sedimento (S) del área intermareal a una profundidad de 10 a 30 cm y muestras de agua de mar (M) de la costa de Comodoro Rivadavia. Los sitios de muestreo fueron tres (Fig. 1): el primero ubicado en la zona sur de la ciudad (CR1: S45°52,954-WO67°30,205) cercano al desagüe de efluentes cloacales del barrio industrial, el cual cuenta con una mayoría de empresas dedicadas a actividades relacionadas con la industria del petróleo; los sedimentos de sus playas se encuentran constituidos principalmente por arena. El segundo sitio de muestreo se ubicó en la zona centro (CR2: S45°52,150-WO67°29,052), cercano a los desagües de efluentes cloacales provenientes principalmente de comercios y viviendas de uso particular, y el tercer sitio de muestreo se ubicó en la región norte (CR3: S45°50-466 WO67°27,983), a unos 200 metros de una boya de descarga de combustible para abastecimiento de la ciudad y a 300 m aproximadamente, del desagüe de efluentes cloacales de la zona, el cual cuenta con un tratamiento de sus aguas. Los sedimentos de estos últimos dos lugares se encuentran constituidos por grava. Las muestras de sedimento, como las de agua de mar, fueron recolectadas en bajamar en frascos de vidrio estéril y conservadas a 4°C hasta su procesamiento.

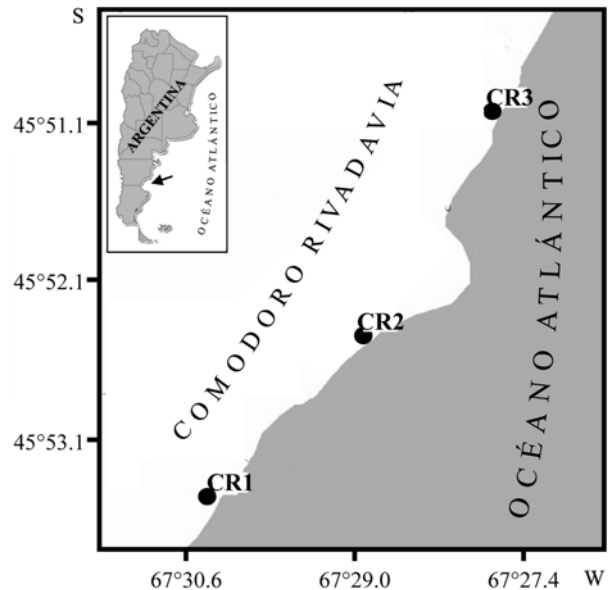


Figura 1

Ubicación geográfica de los muestreos de sedimento y agua de mar en la ciudad de Comodoro Rivadavia. CR1, CR2 y CR3 = sitios de muestreo 1, 2 y 3 respectivamente

Geographic location of sediment and sea water sampling in Comodoro Rivadavia City. CR1, CR2 and CR3 = sampling sites 1, 2 and 3, respectively

De cada sitio se tomaron cuatro muestras en el transcurso de un año, una por cada estación estival. Se tomó la temperatura del agua *in situ* en cada muestreo.

Análisis físico y químico

En las muestras de agua de mar el pH se midió mediante un electrodo de vidrio. El contenido de amonio se determinó con azul de indofenol y el fosfato con azul de molibdeno. El nitrito se determinó por colorimetría con ácido sulfanílico y 1-naftilamina y el nitrato con brucina en presencia de ácido sulfúrico. El contenido de sulfato se determinó por el método turbidimétrico basado en su precipitación en medio ácido y el cloruro fue determinado por el método de Mohr (Pucci & Pucci 2003).

Análisis microbiológico

Para determinar la presencia de bacterias coliformes totales y fecales, se utilizó el método de filtración por membrana con un diámetro de poro de 0,22 µm. Se filtraron 10 mL de agua de mar para coliformes totales y 100 mL para coliformes fecales. La temperatura de incubación fue de 37 y 44°C respectivamente durante 24

a 48 h. El medio de cultivo utilizado fue ENDO según EPA-600/ 8-78-017.

La determinación de bacterias aerobias heterótrofas se realizó por el método de diseminación en superficie a partir de diluciones seriadas de las muestras en agua de mar envejecida y estéril, las placas se incubaron a 28°C durante 15 días. Se utilizaron dos medios de cultivo: BRN, bacterias aerobias heterótrofas (tripteína bacteriológica 5 g, extracto de levadura 1 g, K_2HPO_4 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, agar - agar 15 g, agua de mar envejecida y estéril 700 mL, agua destilada 300 mL, pH 7,2) y BBR, bacterias aerobias oligotróficas (tripteína bacteriológica 0,5 g, extracto de levadura 0,5 g, K_2HPO_4 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, agar-agar 15 g, agua de mar envejecida y estéril 700 mL, agua destilada 300 mL, pH 7,2).

Para la detección de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) se utilizó la técnica de diseminación en superficie en medio mineral con el agregado de 30 μ L de una mezcla 1:1 de petróleo gasoil (MM-PGO) por placa según Pucci & Pucci (2003); la temperatura de incubación fue de 28°C por 15 días.

Todos los medios de cultivo fueron preparados con agua de mar estéril tomada de la zona carente de contaminación antrópica, la que fue envejecida para eliminar la materia orgánica. De esta manera los medios de cultivo contenían los mismos minerales y una concentración salina aproximada a la existente en la zona, permitiendo un mejor desarrollo de la población bacteriana.

Selección y aislamiento de cepas bacterianas

De las diferentes placas de recuento realizadas en las cuatro estaciones del año, se aislaron 469 cepas para su posterior identificación por FAME. Como criterio para seleccionar los cultivos a estudiar, se tomó el de aislar, a partir de las placas de recuento, todas las cepas que se observaron formando colonias aisladas. Las cepas seleccionadas fueron aisladas hasta cultivo puro con sucesivos repiques en agar nutritivo (tripteína 17 g, peptona de soya 3 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 2,5 g, glucosa 2,5 g, agua de mar 1000 mL, pH 7,3).

Identificación de cepas bacterianas

La identificación de las cepas seleccionadas se realizó por FAME. La extracción de los ácidos grasos de membrana se realizó sobre 40 mg de bacterias comenzando con una saponificación con alcohol metílico-hidróxido de sodio-agua 150 mL: 45 g: 150 mL, seguida de una metilación con ácido clorhídrico 6 N y alcohol metílico, 325 mL: 275 mL, y a continuación una

extracción con n-hexano-metil terbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua, 10,8 g - 900 mL (Härtig *et al.* 2005).

Los ácidos grasos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud y 0,2 mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 series II GC, inyección 'splitless'; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-288°C a 28°C min⁻¹, 288-310°C a 60°C min⁻¹, 1,5 min de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama (Pucci & Pucci 2006). La integración de los picos se efectuó mediante HP 10.01 Chem Station, los ácidos grasos fueron identificados utilizando Sherlock 6.0 (MIDI Inc., Newark, Del.) con el estándar Agilent 'Calibration standards kit for the microbial identification system'. La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico.

Se tomó como criterio de identificación de los microorganismos que el índice de similitud fuera mayor a 0,5 considerando lo propuesto por Brow & Leff (1996), y que valores comprendidos entre 0,3 y 0,5 de este índice identifica a la cepa como un cultivo atípico.

Cinética de mineralización de hidrocarburos

El potencial de biodegradación se determinó por dosaje del dióxido de carbono (CO₂) producido a partir del hidrocarburo ensayado (Bartha 1979). Se trabajó con microcosmos confeccionados en frascos de 250 mL de capacidad con cierre perfecto. Los mismos se diseñaron por triplicado a partir de cada una de las muestras con 50 mL de agua de mar o con 5 g de sedimento en 45 mL de agua de mar envejecida y estéril. A todos se les adicionó 50 μ L de una solución de nutrientes denominada HBD (K_2HPO_4 1 g, $(NH_4)_2PO_4$ 2 g, agua destilada 1000 mL, pH 7). Como fuente de carbono se colocaron 25 μ L de gasoil en cada microcosmo. Para capturar el CO₂ producido en el sistema por la mineralización de la fuente carbonada, se colocó, dentro del mismo, un frasco colector con hidróxido de sodio 3 N. El hidróxido de sodio se renovó y tituló semanalmente con ácido clorhídrico 0,1 N, utilizando fenolftaleína y heliantina como indicadores del punto final. Como blanco del experimento se realizó un microcosmo con iguales características a lo anteriormente mencionado, sin la adición de gasoil, para cada una de las muestras. Los valores de mineralización obtenidos con el sistema blanco, se restaron de los demás para así conocer la mineralización producida sólo por el gasoil incorporado. Todos los sistemas se incubaron en oscuridad, a 28°C por 50 días. Los microcosmos se agitaron de forma manual una vez por semana para su aeración.

Análisis estadístico

Los valores de mineralización y recuento se analizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa BIOM (Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage, Setauket, NY 11711 USA). Para el análisis de los perfiles de FAME obtenidos se realizó un estudio de componentes principales utilizando el programa PASS.

Resultados

El análisis físico y químico de las muestras de agua indicó que éstas poseen parámetros dentro de los rangos normales para este tipo de ambiente (Gallardo *et al.* 2004). La temperatura fue de $16 \pm 1,5^\circ\text{C}$ para las estaciones de verano y primavera, para otoño e invierno fue de $12 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Las determinaciones de pH no mostraron variaciones importantes durante todo el tiempo de muestreo, con un valor promedio de $7,7 \pm 0,4$. La salinidad de las muestras de agua de mar estuvo en el orden de $17260 \pm 1870 \text{ mg L}^{-1}$ para cloruros y de $2760 \pm 412 \text{ mg L}^{-1}$ para sulfatos. En los sitios 2 y 3 no se detectó amonio, nitrato, nitrito ni fosfato. En el sitio 1 se encontraron $4,1 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de fosfato y $3,3 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato.

El sitio 1 (CR1) tuvo el mayor número de coliformes totales (UFC mL^{-1}), los que fueron detectados en todas las estaciones del año a excepción de invierno (Tabla 1). Con respecto a la presencia de coliformes fecales para la estación CR1, se detectaron solo en primavera y verano. En el sitio 2 (CR2), se encontraron bacterias coliformes totales en dos épocas del año; los microorganismos coliformes fecales solo se observaron en una época del año, coincidiendo con la muestra 1 con la presencia de los mismos en las épocas más calurosas del año, como es el verano. En el lugar de muestreo 3 (CR3), sólo se

encontraron microorganismos coliformes totales en otoño. En el sitio 2 (CR2), se encontraron bacterias coliformes totales en dos épocas del año, los microorganismos coliformes fecales solo se observaron en una época del año.

Los recuentos bacterianos obtenidos en los medios BBR y BRN fueron dependientes del lugar de toma de muestra y de la estación del año, con una leve tendencia a observar mayor número de microorganismos en las muestras de sedimento que en las de agua de mar (Tabla 2). La muestra CR1, mostró los resultados más elevados para los recuentos de agua de mar. Tanto para BBR como para BRN, estos resultados fueron mayores en el período de verano, estando esto de acuerdo con lo observado para los microorganismos coliformes. En CR2 se encontró el mayor recuento en otoño para BBR y en las estaciones de otoño e invierno para BRN. En CR3, el número de bacterias que desarrollaron en BBR fue superior en otoño y verano, mientras que en BRN fue en verano e invierno. Con respecto al medio MM-PGO, se observó que el número de Unidades Formadoras de Colonias crecidas estuvo en concordancia con lo señalado para BBR y BRN. El sitio CR1 presentó la mayor cultivabilidad en verano, tanto para sedimento como para agua de mar, siendo este sitio el de mayor carga bacteriana de los tres estudiados.

Los ensayos realizados en las muestras de agua de mar (Fig. 2) indicaron que los sitios CR1 (M1) y CR2 (M2) siguieron una tendencia similar de mineralización de gasoil a lo largo del año, no ocurriendo lo mismo en CR3 (M3), lugar que posee una tendencia diferente. En los tres lugares de muestreo existieron buenas mineralizaciones en primavera y verano con una tasa de mineralización de aproximadamente $25 \text{ mg CO}_2 \text{ L}^{-1}$, a excepción de CR3 (M3), que mostró baja mineralización en verano ($11 \text{ mg CO}_2 \text{ L}^{-1}$). En las estaciones más frías del año, otoño e invierno, la producción de CO_2 fue moderada en todos los sitios, con tasas de mineralizaciones comprendidas entre 11 y $14 \text{ mg CO}_2 \text{ L}^{-1}$, destacándose el sitio CR1, que fue el más eficaz en estas estaciones.

Los estudios de mineralización de gasoil en las muestras de sedimento (Fig. 3) mostraron que los sitios CR2 y CR3 poseen un patrón de producción de CO_2 similar a lo largo del año. En ambos lugares de muestreo, la mejor mineralización fue durante el verano (50 a $80 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1}$). El sitio CR1 fue el más eficaz al mineralizar el gasoil en las estaciones de verano, otoño e invierno con tasas de mineralización de 292, 200 y $252 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1}$, respectivamente. El valor de producción de CO_2 observado en primavera fue similar a los demás sitios ($20 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1}$).

Tabla 1

Recuento de bacterias coliformes totales y coliformes fecales (UFC mL^{-1}) en muestras de agua. CR1, CR2 y CR3 = sitios de muestreo 1, 2 y 3 respectivamente

Total and faecal coliforms counts (UFC mL^{-1}) in water. CR1, CR2 and CR3 = sampling sites 1, 2 and 3, respectively

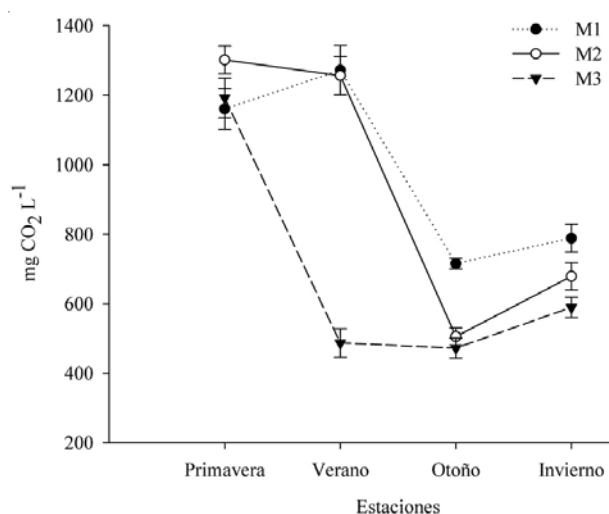
Coliformes totales	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
CR1	$7,0 \times 10^1$	$5,6 \times 10^3$	$9,8 \times 10^1$	-
CR2	-	$1,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	-
CR3	-	-	$2,2 \times 10^2$	-
Coliformes fecales				
CR1	$9,9 \times 10^1$	$2,4 \times 10^3$	-	-
CR2	-	$5,5 \times 10^1$	-	-
CR3	-	-	-	-

Tabla 2

Recuentos de bacterias en los medios de cultivo de BBR, BRN y PGO (UFC g⁻¹ y UFC mL⁻¹) para sedimentos (S) y agua de mar (M). Los números 1, 2 y 3 corresponden a los sitios de muestreo CR1, CR2 y CR3, respectivamente

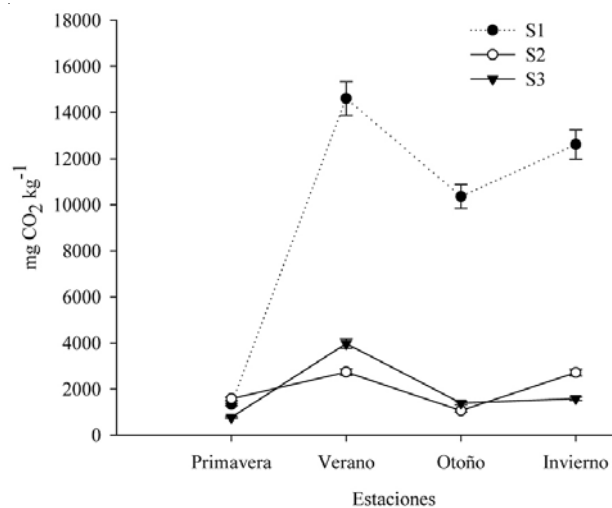
Bacteria counts in BBR, BRN and PGO culture media (UFC g⁻¹ and UFC mL⁻¹) for sediments (S) and water (M). Numbers 1, 2 and 3 correspond to sampling sites CR1, CR2 and CR3, respectively

Medio de cultivo	Muestra	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
BBR	CR-M-1	3,0x10 ¹	4,2x10 ⁵	9,4x10 ³	3,3x10 ³
	CR-M-2	8,1x10 ²	4,9x10 ²	3,2x10 ³	7,0x10 ¹
	CR-M-3	4,0x10 ²	1,3x10 ³	1,2x10 ³	4,1x10 ²
	CR-S-1	7,0x10 ²	6,8x10 ³	3,8x10 ³	1,9x10 ³
	CR-S-2	1,5x10 ⁵	9,7x10 ⁴	8,0x10 ²	6,2x10 ³
	CR-S-3	1,7x10 ⁴	-	3,3x10 ⁴	3,0x10 ²
BRN	CR-M-1	5,0x10 ¹	4,5x10 ⁵	2,6x10 ⁴	8,0x10 ³
	CR-M-2	8,9x10 ²	6,8x10 ²	2,4x10 ³	8,2x10 ³
	CR-M-3	5,5x10 ²	1,0x10 ³	4,7x10 ²	1,4x10 ³
	CR-S-1	2,7x10 ²	5,1x10 ³	2,3x10 ³	1,3x10 ⁴
	CR-S-2	2,2x10 ⁵	1,0x10 ⁵	1,0x10 ⁴	6,7x10 ³
	CR-S-3	9,5x10 ³	-	2,9x10 ⁴	2,1x10 ²
PGO	CR-M-1	2,8x10 ²	5,2x10 ⁵	1,2x10 ⁴	1,4x10 ³
	CR-M-2	6,1x10 ²	9,7x10 ²	1,7x10 ³	5,5x10 ²
	CR-M-3	2,9x10 ³	2,9x10 ³	2,7x10 ²	2,1x10 ²
	CR-S-1	1,0x10 ¹	1,8x10 ⁵	9,7x10 ³	3,1x10 ²
	CR-S-2	2,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴	4,5x10 ³	4,6x10 ³
	CR-S-3	1,6x10 ⁴	3,1x10 ³	3,5x10 ⁴	2,4x10 ³

**Figura 2**

Acumulación de CO₂ en la utilización de gasoil en agua de mar (M). M1, M2 y M3 = sitios de muestreo 1, 2 y 3 respectivamente

Accumulation of CO₂ in the use of gasoil in seawater (M). M1, M2 y M3 = sampling sites 1, 2 and 3, respectively

**Figura 3**

Acumulación de CO₂ en la utilización de gasoil en sedimento (S). S1, S2 y S3 = sitios de muestreo 1, 2 y 3 respectivamente

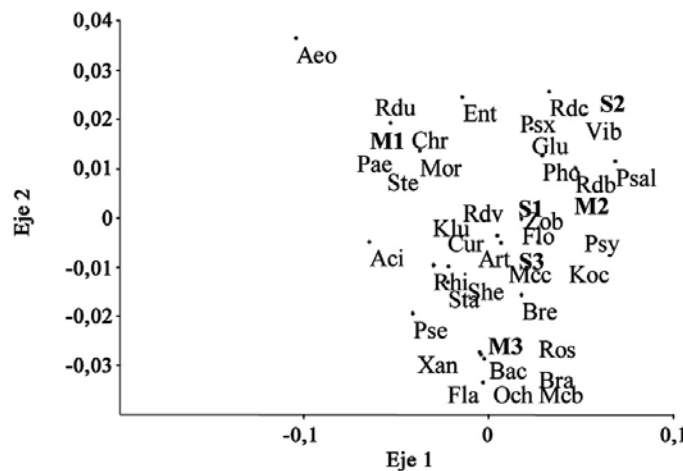
Accumulation of CO₂ in the use of gasoil in sediment (S). S1, S2 y S3 = sampling sites 1, 2 and 3, respectively

Identificación de cepas bacterianas

Un total de 469 cepas fueron aisladas a partir de los diferentes sitios de toma de muestras. Sólo se identificaron 236 cepas, las que pertenecieron a 37 géneros y 54 especies. El resto de las 233 cepas correspondieron a microorganismos que no se encontraban en la base de datos utilizada. Los géneros bacterianos identificados con mayor frecuencia en la costa de Comodoro Rivadavia resultaron ser *Pseudoalteromonas*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Aeromonas* sp., todas con una frecuencia de aparición mayor a 15. Otro grupo de microorganismos encontrado con una elevada frecuencia fueron las enterobacterias, siendo característica la aparición de los géneros *Enterobacter*, *Escherichia* y *Citrobacter*. Con una frecuencia de entre 5 y 10 aislamientos se identificó a los géneros bacterianos *Rhodobacter*, *Ochrobactum*, *Vibrio*, *Staphilococcus*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Brevundimonas* y *Shewanella*.

Los microorganismos con una frecuencia de recuperación menor al 0,1%, resultaron ser *Flavimonas*, *Gluconobacter asaii/cerinus/oxydans*, *Micrococcus* y *Rhodovulum sulfidophilum*, todos recuperados cuatro

veces en el total de las muestras. Tres veces fueron aislados *Kluyveria cryocrescens*, *Pseudoxantomonas* sp., *Rhodococcus*, *Shewanella putrefaciens/algae*. Los microorganismos *Aerococcus viridans*, *Chryseomonas luteola*, *Curtobacterium flaccunfaciens*, *Enterobacter cancerogenus* (*Erwinia cancerogena*), *Grimontia hollisea*, *Microbacterium*, *Moraxella catarrhalis* y *Rhizobium radiobacter* se identificaron dos veces cada uno y se encontró un aislamiento de *Paenibacillus alginolyticus*, *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*, *Photobacterium luminescens luminescens*, *Proteus vulgaris*, *Psychrobacter immobilis*, *Roseomonas fauriae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Xanthobacter flavus*, *Yersinia frederiksenii* y *Zobellia ulginosa*. El gran número de géneros y especies bacterianas encontradas en la zona, indican la presencia de comunidades bacterianas constituidas por una importante diversidad de microorganismos. Los aislamientos no identificados por el sistema utilizado resultaron ser todos diferentes entre sí debido a que se encontraron separados unos de otros con un valor de distancia euclidiana mayor a 10 en el estudio de similitud realizado (datos no mostrados).

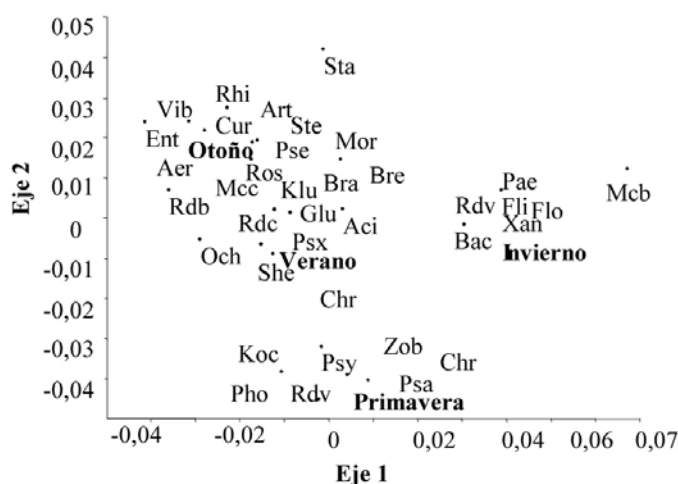


Aci: *Acinetobacter*, Aec: *Aerococcus*, Aeo: *Aeromonas*, Art: *Arthrobacter*, Bac: *Bacillus*, Bra: *Bradyrhizobium*, Bre: *Brevundimonas*, Chr: *Chryseomonas*, Cur: *Curtobacterium*, Ent: Enterobacterias, Fli: *Flavimonas*, Flo: *Flavobacterium*, Glu: *Gluconobacter*, Klu: *Kluyveria*, Koc: *Kocuria*, Mcb: *Microbacterium*, Mcc: *Micrococcus*, Mor: *Moraxella*, Och: *Ochrobactrum*, Pae: *Paenibacillus*, Phot: *Photobacterium*, Pse: *Pseudomonas*, Psx: *Pseudoxantomonas*, Psy: *Psychrobacter*, Rhi: *Rhizobium*, Rdv: *Rhodovulum*, Rdb: *Rhodobacter*, Rdc: *Rhodococcus*, Rdu: *Rhodovulum*, Ros: *Roseomonas*, She: *Shewanella*, Sta: *Staphilococcus*, Ste: *Stenotrophomonas*, Vib: *Vibrio*, Xan: *Xanthobacter*, Zob: *Zobellia*, Psa: *Pseudoalteromonas*.

Figura 4

Análisis de componentes principales de los sitios y la densidad de los géneros bacterianos. M1, M2 y M3 = agua de mar 1, 2 y 3 respectivamente. S1, S2 y S3 = sedimentos 1, 2 y 3 respectivamente

The principal components analysis of sites and the density of the bacterial genera. M1, M2 and M3 = seawater 1, 2 and 3 respectively. S1, S2 and S3 = sediment 1, 2 and 3 respectively



Aci: *Acinetobacter*, Aec: *Aerococcus*, Aeo: *Aeromonas*, Art: *Arthrobacter*, Bac: *Bacillus*, Bra: *Bradyrhizobium*, Bre: *Brevundimonas*, Chr: *Chryseomonas*, Cur: *Curtobacterium*, Ent: *Enterobacterias*, Fli: *Flavimonas*, Flo: *Flavobacterium*, Glu: *Gluconobacter*, Klu: *Kluyvera*, Koc: *Kocuria*, Mcb: *Microbacterium*, Mcc: *Micrococcus*, Mor: *Moraxella*, Och: *Ochrobactrum*, Pae: *Paenibacillus*, Pho: *Photobacterium*, Pse: *Pseudomonas*, Psx: *Pseudoxanthomonas*, Psy: *Psychrobacter*, Rhi: *Rhizobium*, Rdv: *Rhodovulum*, Rdb: *Rhodobacter*, Rdc: *Rhodococcus*, Rdu: *Rhodovulum*, Ros: *Roseomonas*, She: *Shewanella*, Sta: *Staphylococcus*, Ste: *Stenotrophomonas*, Vib: *Vibrio*, Xan: *Xanthobacter*, Zob: *Zobellia*, Psa: *Pseudoalteromonas*.

Figura 5

Análisis de componentes principales de las cuatro estaciones del año y de la densidad de los géneros bacterianos

The principal components analysis of season and the density of the bacterial genera

Las cepas cultivables identificadas se agruparon en una nube donde *Aeromonas* se halla más alejada del resto (Fig. 4). Analizados los sedimentos estudiados, se encontró que dos de ellos se colocaron muy cercanos entre sí, siendo el perteneciente al sitio CR2 (S2), el que más se alejó de los demás. Esto indica que los microorganismos encontrados en CR1 (S1) y CR3 (S3) son de iguales características con respecto a su identidad y que en CR2 (S2), la comunidad bacteriana presente estaría constituida por una biodiversidad bacteriana algo diferente a los otros sitios de muestreo. El análisis de ordenamiento de grupos bacterianos de las muestras de agua de mar determinó que las tres muestras de agua de mar se diferenciaron mucho entre sí, con una composición diferente de microorganismos recuperados de las mismas. Las muestras de los sitios CR1 (M1) y CR2 (M2), con mayor frecuencia de recuentos positivos de coliformes, se encuentran caracterizadas por los microorganismos marcadores de contaminación fecal, enterobacterias.

En cuanto a la distribución de los microorganismos con respecto a las estaciones del año (Fig. 5), se observó en otoño la mayor biodiversidad, encontrando en invierno mayor cantidad de bacterias Gram positivas.

Discusión

La ciudad de Comodoro Rivadavia, en los últimos años, presentó un crecimiento sostenido en el número de habitantes. Esto superó a la infraestructura sanitaria existente, que ya era limitada antes del crecimiento. Los tres sitios presentaron marcadores de contaminación antrópica, debido a la presencia de coliformes y presencia de bacterias degradadoras de petróleo (Tablas 1 y 2). Si bien en CR1 y CR2 están presentes emisarios cloacales, el sitio CR1 está ubicado en la zona de mayor actividad industrial de la ciudad, que mayoritariamente se dedica al rubro de servicios petroleros. Esto puede justificar la presencia de cepas degradadoras de hidrocarburos en CR1, situación que la asemeja al sitio CR3 que posee un emisario cloacal con tratamiento, el cuál está cercano a una boya de descarga de hidrocarburos destilados del petróleo. Las diferencias con respecto a estos resultados en los distintos puntos de muestreo pueden estar generadas por la presencia, en CR1, de un vertedero de líquidos cloacales en la playa. Este tipo de vertederos también se encuentra en CR2, pero a diferencia de CR1, el mismo está dentro del lecho marino. El sitio CR3, con menos frecuencia de microorganismos marcadores de contaminación fecal, posee vertederos de efluentes cloacales con un tratamiento previo a la liberación de las aguas.

Los recuentos bacterianos observados en las muestras de agua de mar son menores que los de sedimentos, apoyando lo propuesto por Süß *et al.* (2004) de que este suceso se debe al soporte que dan a los microorganismos los distintos tipos de partículas que forman los sedimentos.

En el agua de mar, la cantidad de nutrientes es baja. Por ello no se presentó diferencia en los desarrollos bacterianos. En los sitios CR1 y CR2, por estar próximos a lugares de vertederos de líquidos cloacales no tratados, la materia orgánica es mayor, pero igualmente esto no modificó los desarrollos, lo que nos permite pensar que los microorganismos presentes se adaptan fácilmente a los cambios de nutrientes. El desarrollo en el medio con hidrocarburos indicaría también que la comunidad está adaptada a la presencia de estos compuestos. El sitio CR1, ubicado en el barrio industrial, cuyo principal ramo industrial es el de servicios petroleros fue el que mostró uno de los mayores recuentos de BDH en este estudio. Los otros dos sitios presentaron valores similares de desarrollo. Estos resultados confirman la contaminación que se encuentra presente en nuestra costa y de la capacidad de la comunidad bacteriana para poder combatirla. Otros autores (Esteves & Commendatore 1993, Commendatore *et al.* 2000) observaron la presencia de hidrocarburos en moluscos e hidrocarburos alifáticos en la costa del puerto de la ciudad asociados a la presencia de arena.

La mineralización de gasoil en medio líquido favorece a los microorganismos de rápido desarrollo (Atlas & Bartha 2002), mientras que la buena utilización de hidrocarburos en los sedimentos se debe a que estos son mejores soportes para los hidrocarburos y los microorganismos (Stoeck *et al.* 2002), favoreciendo su utilización y la mayor carga bacteriana en los mismos. El hecho que el mejor resultado se obtuviera en el sitio CR1 es por que fue el único compuesto por arena fina, ya que los otros dos son de grava. Los valores de mineralización obtenidos en los sedimentos marinos son similares a los que se obtienen en buenos 'landfarming' (Riiss *et al.* 2002). Los valores en agua de mar fueron menores motivados por la hidrofobicidad que existe entre el agua y los hidrocarburos que limita la utilización de estos últimos por parte de las bacterias (Atlas & Bartha 1972).

Las bacterias aisladas e identificadas son bacterias heterótrofas encontradas habitualmente en aguas de mar. El 49,7% de las cepas presentaron valores de similitud menores a 0,3; de 0,5 a 0,3 se consideran identificadas, pero como cultivos atípicos según Brown & Leff (1996), lo que indica que existe una diversidad aún mayor que no se encuentra en la última versión de la base de datos de MIDI utilizada. El 50,3% pertenece a cepas identificadas

de las cuales no se hallaron cultivos iguales (datos no mostrados), con excepción del grupo de las enterobacterias, las identificaciones coinciden con géneros hallados frecuentemente en aguas y sedimentos marinos en la región de estudio (Gallardo *et al.* 2004).

Se hallaron cepas con capacidad de degradar hidrocarburos como *Pseudomonas* sp., las que poseen una capacidad excelente de desarrollo en medios líquidos y de crecimiento rápido cuando las condiciones las favorecen, siendo ampliamente conocida su capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono (Vacca *et al.* 2002). Estas bacterias se encuentran frecuentemente en suelos patagónicos altamente contaminados con hidrocarburos (Pucci & Pucci 2003, Vacca *et al.* 2002). Algunos géneros hallados, entre los cuales destaca *Acinetobacter*, han sido descritos en ambientes como la antártica, que se caracteriza por producir biosulfactantes, que aumentan la biodisponibilidad de los productos insolubles en agua (Toren *et al.* 2001, Ron *et al.* 2002). La mayor presencia fue de *Pseudoalteromonas*, bacterias que se encuentran en medios marinos y poseen capacidad de utilizar hidrocarburos; este género está relacionado con *Alteromonas* y *Shewanellas*, todas ellas Gammaprotobacterias heterotróficas marinas (Ivanova *et al.* 2004). Bacterias del género *Shewanella* han sido estudiadas en la última década debido a que poseen un importante rol en el co-metabolismo durante la biorremediación de compuestos del tipo halogenado, derivados del petróleo y reductores del magnesio y óxido de hierro. Sin embargo, una de sus principales características es su habilidad de producir ácidos grasos poliinsaturados (Russell & Nichols 1999).

La frecuencia de encuentro de las cepas identificadas estuvo marcada por la contaminación que recibe el sitio de muestreo. La presencia de efluentes de líquidos cloacales generó que las cepas de enterobacterias identificadas se aproximaran, en el análisis de componentes principales, a los sitios CR1 y CR2. Este tipo de microorganismos posee la capacidad de permanecer durante largos periodos en sedimento (Vieira *et al.* 2001) y demuestra el grado de contaminación de origen fecal que contienen estas dos playas de la ciudad. Esto último es de suma importancia debido al riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas por vía fecal oral. Según la nota técnica 29 de OPS-OMS (Salas 2000), los valores de coliformes totales y fecales encontrados en el agua de estos dos sitios, hacen que las mismas no sean aptas para uso recreacional. En el sitio CR3, el estado de contaminación fecal observado fue mucho menor, encontrando coliformes totales solo en el otoño. Esto muestra la importancia que posee el correcto tratamiento de los efluentes que son liberados al mar, atribuyendo la

presencia de este tipo de microorganismos en este sitio a un hecho puntual y aislado en esta playa. Las muestras de sedimento CR1 y CR3 están relacionados por las cepas que son capaces de utilizar hidrocarburos, esto es debido a que en ambos lugares de muestreo hay posibles fuentes de contaminación por hidrocarburos, una boya de descarga de combustibles en CR3 y descargas de efluentes sin tratamientos del barrio industrial de la ciudad en CR1. Esto demuestra una gran adaptación de los microorganismos de la zona para remediar pequeños derrames accidentales de hidrocarburos.

La frecuencia de cepas bacterianas por estaciones estaría relacionada con la temperatura ambiente de la zona; en invierno se favorece el hallazgo de cepas Gram positivas, como *Rhodococcus*, que poseen mayor capacidad de sobrevida en condiciones adversas. Este género posee capacidad de utilizar diversos hidrocarburos por su enorme versatilidad catabólica (Ruberto *et al.* 2005, Whyte 1999). En primavera esto se modificó, observándose cepas que poseen un desarrollo más rápido como las Gram negativas, debido a que, al existir un clima más favorable para el desarrollo bacteriano, la competencia por los escasos nutrientes es mayor y solo desarrollan los microorganismos con mayor velocidad de crecimiento (Gallardo *et al.* 2004).

Este estudio ha encontrado que la biodiversidad bacteriana cultivable en la costa de Comodoro Rivadavia es importante y que las comunidades de los diferentes lugares de muestreo serían constituidas en función a la calidad de sus aguas. Es importante remarcar que la principal industria que posee la ciudad es la relacionada con la extracción de hidrocarburos y que los microorganismos presentes en la costa poseen un importante potencial de biodegradación de este tipo de compuestos.

Agradecimientos

Al personal técnico del Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada por su colaboración en la realización de los ensayos de laboratorio y al proyecto PNUD ARG/02/018 - Donación GEF N° 28.385-AR por el financiamiento recibido. También agradecemos las observaciones realizadas por los revisores anónimos que ayudaron a mejorar la calidad del presente trabajo.

Literatura citada

Alexander M. 1999. Environmental effects. En: Alexander M (ed). Biodegradation and bioremediation 13: 226-247. Academic Press, San Diego.

Atlas RM & R Bartha. 1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Canadian Journal of Microbiology and Biotechnology 18: 1851-1855.

Atlas RM & R Bartha. 2002. Desarrollo de las comunidades microbianas. En: Atlas RM & R Bartha (eds). Ecología microbiana y microbiología ambiental 6: 173-178. Addison Wesley, Madrid.

Bartha R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Applied Environmental Microbiology 37: 729-239

Boschker HTS, WD Graaf, M Köster, LA Meyer-Reil & TE Cappenberg. 2001. Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. Microbiology Ecology 35: 97-103.

Brown BJ & LG Leff. 1996. Comparison of fatty methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 62: 2183-2185.

Commendatore M, JL Esteves & JC Colombos. 2000. Hydrocarbons in coastal sediments of Patagonia Argentina: levels and probable Source. Marine Pollution Bulletin 40: 989-998.

Environmental Protection Agency. 1978. Microbiological methods for monitoring the environment. Water and Wastes 600/8-78-017: 5-31.

Esteves JL & M Commendatore. 1993. Total aromatic hydrocarbons in water and sediment in a coastal zone of Patagonia Argentina. Marine Pollution Bulletin 26: 341-342.

Gallardo AA, S Risso, MA Fajardo & S Estevas-Belchior. 2004. Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 54: 337-345.

Härtig C, N Loffhagen & H Harms. 2005. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. Applied Environmental Microbiology 71: 1915-1922.

Ivanova EP, S Flavier & R Christen. 2004. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1773-1788.

Kieft TL, E Wilch, K O'Connor, DB Ringelberg & DC White. 1997. Survival and phospholipids fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. Applied and Environmental Microbiology 63: 1531-1542.

- Margesin RD, F Labb, CW Schinner & LG Whyte. 2003.** Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3085-3092.
- Michaud L, AL Giudice, M Saitta, M de Domenico & V Bruni. 2004.** The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Marine Pollution Bulletin* 49: 405-409.
- Panicker G, JA Islabie, D Saul & AK Bej. 2002.** Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. isolated from oil-contaminated soil, Antarctica. *Polar Biology* 25: 5-11.
- Pucci GN & OH Pucci. 2003.** Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburo previamente sometidas a landfarming. *Revista Argentina de Microbiología* 35: 62-68.
- Pucci GN & OH Pucci. 2006.** Cambios en los ácidos grasos de membrana de *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 con diferentes temperaturas y osmolaridades. *Acta Biologica Colombiana* 11: 61-73.
- Riis V, B Wolfgang & OH Pucci. 2002.** Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere* 49: 559-568.
- Ron E & E Zand Rosenberg. 2002.** Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 249-252.
- Ruberto LA, S Vazquez, A Lobaldo & WP MacCormack. 2005.** Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. *Antarctic Soils* 17: 47-56.
- Russell NJ & DS Nichols. 1999.** Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria a dogma rewritten. *Microbiology* 145: 767-779.
- Salas HJ. 2000.** Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). OPS-OMS. Hojas de Divulgación Técnica 29: 1-11.
- Stoeck T, I Kröncke, G Duineveld & A Palojarvi. 2002.** Phospholipid fatty acid profiles at depositional and non-depositional sites in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series* 241: 57-70.
- Süss J, B Engelen, H Cypionka & H Sass. 2004.** Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation dependent methods. *Microbiology Ecology* 51: 109-121.
- Toren F, S Navon-Venezia, EZ Ron & E Rosenberg. 2001.** Emulsifying activities of purified Alaskan proteins from *Cinetobacter radioresistens* KA53. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1102-1106.
- Vacca GS, B Kiesel, L Wünsche & OH Pucci. 2002.** Análisis de genes catabólicos de hidrocarburos aromáticos en cepas aisladas de suelos de la Patagonia. *Revista Argentina de Microbiología* 34: 138-149.
- Vieira RHSE, DP Rodrigues, EA Menezes, NSS Evangelista, EMF Reis, LM Barreto & FA Gonçalves. 2001.** Microbial contamination of sand from major beaches in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 1-4.
- Whyte LG, SJ Slagman, F Pietrantonio, L Bourbonniere, SF Koval, JR Lawrence, E Innis & CW Greer. 1999.** Physiological adaptation involved in alkane assimilation at a low temperature by a *Rhodococcus* sp. Strain Q15. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2961-2968.

Recibido el 30 de junio de 2008 y aceptado el 24 de octubre de 2008