

---

## DIVERSIDAD DE BACTERIAS CULTIVABLES DE LA COSTA DE CALETA OLIVIA, PATAGONIA, ARGENTINA

### Diversity Of Cultivable Bacteria From The Coast Of Caleta Olivia, Patagonia, Argentina

GRACIELA PUCCI<sup>1</sup>, ADRIÁN ACUÑA<sup>2</sup>, MARÍA L. LLANES<sup>3</sup>,  
MARÍA C. TIEDEMANN<sup>3</sup>, OSCAR H. PUCCI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Jefa de trabajos Prácticos de Microbiología Ambiental. Investigadora de CEIMA.

<sup>2</sup> Jefa de trabajos Prácticos de Farmacología. Investigadora de CEIMA.

<sup>3</sup> Auxiliar de Microbiología General. Investigadora de CEIMA

<sup>4</sup> Profesor titular de Microbiología General. Director de CEIMA.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. CEIMA.

Graciela Pucci. Ruta Provincial N.º 1; km 4, Comodoro Rivadavia

CP 9000. Chubut - Argentina. granapu@unpata.edu.ar

Presentado 16 de octubre de 2008, aceptado 20 de febrero de 2009, correcciones 30 de julio de 2009.

#### RESUMEN

Caleta Olivia es una ciudad que posee boyas por donde se exporta el petróleo crudo obtenido de la zona norte de la provincia de Santa Cruz, Argentina. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar las posibilidades de utilización microbiana de petróleo crudo y sus derivados e identificar las bacterias cultivables que se encuentran presentes en la costa de Caleta Olivia. La mineralización de hidrocarburos se detectó por la producción de dióxido de carbono. Se tomaron muestras de agua de mar y sedimento intermarial de tres sitios. Se realizaron recuentos bacterianos en los medios de cultivo BBR, BRN, medio mineral con petróleo gas oil y ENDO para bacterias coliformes. Las bacterias se identificaron utilizando el sistema de Sherlock de MIDI. Las mineralizaciones evidenciaron la capacidad existente en los microorganismos para la utilización de hidrocarburos. Los recuentos de coliformes fueron negativos. Se aislaron un total de 403 cepas a las que se les realizó la extracción de ácidos grasos e identificación, de ellas solo 172 fueron identificadas por el sistema. Se distribuyeron en 32 géneros y 50 especies bacterianas. El resto, el sistema no las identificó debido a que no halló cepas similares en la base de datos del sistema. *Pseudoalteromonas* fue el género que más se aisló. El análisis de componentes principales asoció al verano y al otoño con la mayor biodiversidad de géneros. Se encontraron representantes de los siguientes géneros: *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas*. Estos microorganismos son citados en la bibliografía como degradadores de hidrocarburos.

**Palabras clave:** bacterias marinas; ácidos grasos, Patagonia.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the oil utilization and identity of the bacterial strains present in the coast Intertidal sediments and marine water from Caleta Olivia city which were analyzed to determine bacterial counts. Five microcosms were designed for sediments and water sample. The microcosms contained 5 g or 50 mL of samples with 0.01% of gasoline, and 0.1% of kerosene, diesel, crude oil and mineral oils. The CO<sub>2</sub> was measured by titration. Four cultural medium were used i.e. BBR, BRN, mineral medium with crude oil and gas oil and ENDO for coliforms. The bacteria were identified by Sherlock -MIDI. The mineralization shows good values. The counts resulted negative to total coliforms and faecal coliforms. 403 strains were analyzed; the system could identify 172 strains in 32 genera in only 50 species. The rest of strains were not found in Sherlock data base (version 6.0). *Pseudoalteromonas* was the genus that was more frequently isolated. The summer and autumn seasons presented more quantity of biodiversity genera. We found genera, which are mentioned as hydrocarbon degrading genera in the literature.

**Key words:** marine bacteria; fatty acids, Patagonia.

## INTRODUCCIÓN

La comunidad bacteriana de los mares nos brinda importante información sobre los diferentes hábitats marinos. Las bacterias son capaces de dar una pronta respuesta a los cambios abióticos y bióticos del medio que las rodea y son una parte importante de la cadena alimenticia de los organismos marinos. Muchos géneros y especies microbianas de los ambientes marinos son capaces de utilizar diferentes compuestos orgánicos, incluidos hidrocarburos, y son los mineralizadores de materia orgánica. Esta capacidad se ve limitada por la biodisponibilidad, cantidad y calidad de los nutrientes y características del ambiente, como la temperatura y radiación solar en las capas superficiales. La biodegradación natural marina esta limitada por los factores ambientales como el oxígeno molecular, nutrientes (fósforo, amonio, nitrato, nitrito y compuestos orgánicos del nitrógeno), sin embargo diversos autores han encontrado la degradación de petróleo en condiciones adversas (Panicker *et ál.*, 2002; Margesin *et ál.*, 2003; Michaud *et ál.*, 2004). Tradicionalmente la diversidad de bacterias marinas se estudia mediante cultivo, aislamiento y pruebas metabólicas con cepas obtenidas a partir de medios de cultivo enriquecidos o bien por técnicas moleculares, ambas técnicas son costosas en materiales y tiempo. También se puede estudiar la diversidad de bacterias a través de la identificación de los ácidos grasos de su membrana por metil ésteres de ácidos grasos FAME (Brown y Leff, 1996).

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la posibilidad de degradación de crudo y sus derivados e identificar bacterias cultivables presentes en el agua y en el sedimento intermareal de la costa de Caleta Olivia, con el fin de poder predecir si las mismas son capaces de solucionar futuras contaminaciones accidentales de hidrocarburos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### TOMA DE MUESTRA

Se tomaron tres muestras de sedimento del área intermareal a una profundidad de 10 a 30 cm y tres muestras de agua de mar a una profundidad de 20 a 30 cm de la columna de agua de la costa de Caleta Olivia. Los sitios de muestreo fueron tres, el sitio uno (1, S 46° 27.583 WO 67° 29.653), el segundo sitio (2, S 46° 27.025 WO 67° 30.03) y el tercer sitio (3, S 46° 26.205 WO 67° 30.792) como se indica en la figura 1. En cada sitio se tomaron muestras en las cuatro estaciones del año. Las muestras de agua y sedimento se procesaron antes de las 2 h de tomada la muestra. Las muestras de agua no se concentraron. Las muestras se denominaron anteponiendo una S antes del número de muestra para sedimentos y una M para agua de mar.

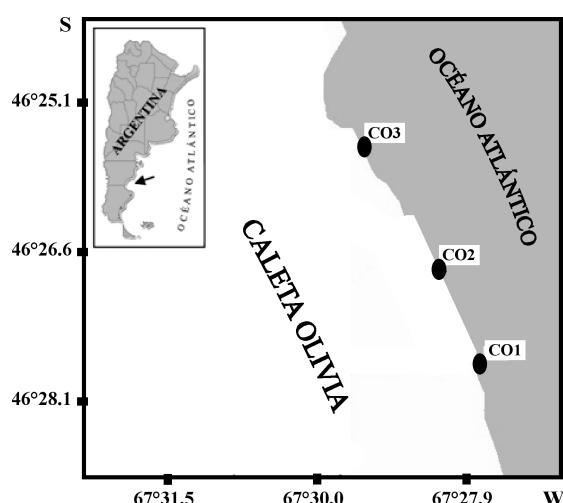


Figura 1. Localización geográfica de las tomas de muestras de los sedimentos y agua de mar de la ciudad de Caleta Olivia, Patagonia, Argentina.

### DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA CULTIVABLE

**Bacterias coliformes totales y fecales.** Se utilizó el método de filtración por membrana. Se filtraron 10 mL de agua de mar para coliformes totales y 100 mL para coliformes fecales. La temperatura de cultivo fue de 37 y 44 °C respectivamente. El medio de cultivo utilizado fue ENDO según EPA-600/ 8-78-017.

**Bacterias aerobias heterotróficas.** Se realizó por el método de diseminación en superficie a partir de diluciones seriadas de las muestras en agua de mar estéril, las placas se incubaron a 28 °C. Se utilizó el medio BRN (en g.L<sup>-1</sup>: Triptéína bacteriológica 5, extracto de levadura 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2; agar-agar 15, agua de mar estéril 700 mL, agua destilada 300 mL, pH 7,2; Pucci *et ál.*, 2009), la temperatura de incubación fue de 28 °C por 21 días.

**Microorganismos aerobios oligotróficos.** Se utilizó el medio BBR (en g.L<sup>-1</sup>: Triptéína bacteriológica 0,5, extracto de levadura 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2; agar-agar 15,

agua de mar estéril 700 mL, agua destilada 300 mL, pH 7,2; Pucci *et ál.*, 2009), la temperatura de incubación fue de 28 °C por 21 días.

**Bacterias degradadoras de hidrocarburos.** Se realizó por la técnica de diseminación en superficie en medio mineral al que se adicionó a la superficie de la placa de Petri 30 µL de una mezcla 1:1 de petróleo gasoil por placa según Pucci y Pucci, 2003, la temperatura de incubación fue de 28 °C por 21 días.

#### **IDENTIFICACIÓN DE CEPAS**

La extracción de ácidos 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 6N y alcohol metílico (325 mL: 275 mL) y a continuación una extracción con n-hexano-metil terbutíl éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10,8 g - 900 mL) de acuerdo con el procedimiento del sistema de identificación (MIDI Newark, Del., USA- [www.midi-inc.com](http://www.midi-inc.com)).

#### **ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS**

Los ácidos grasos fueron determinados como metil ésteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud, 0,2 mm de diámetro, el análisis se llevó a cabo con un cromatografía HP 6890 series II GC (inyección *splitless*; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-288 °C a 28 C/min, 288-310 °C 60 °C/min, 1,5 min de permanencia a 310 °C, detector por ionización de llama, la integración de los pico se efectuó mediante HP 10.01 *Chem Station*, los ácidos grasos fueron identificados utilizando Sherlock (versión 6.0) 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.

#### **MINERALIZACIÓN DE HIDROCARBUROS**

Se realizaron microcosmos por triplicado en frascos de vidrio de un litro de capacidad. Se utilizaron 50 mL de agua de mar o 5 g de sedimento en 45 mL de agua de mar estéril. Todos los microcosmos fueron inoculados con 50 µL de una solución de nutrientes concentrada denominada HDB ( $K_2HPO_4$  100 g,  $(NH_4)_2PO_4$  200 g, agua destilada 1000 mL, pH 7). Como fuente de carbono se utilizó nafta al 0,05% y kerosén, gasoil, petróleo y aceite lubricante al 0,1%. En cada caso se realizó un control, que contenía la muestra y la solución concentrada de nutrientes para conocer el dato de mineralización en las muestras sin el agregado de hidrocarburos. El potencial de biodegradación se determinó por el dosaje del dióxido de carbono ( $CO_2$ ) producido y capturado en un vial con hidróxido de sodio. Este se tituló con ácido clorhídrico valorado, utilizando fenolftaleína y heliantina como indicadores del punto final (Bartha, 1979). Los sistemas se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 50 días. Los resultados graficados representan los valores de mineralización del hidrocarburo ensayado, corregido por los datos obtenidos a partir del control diseñado.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores de los recuentos bacterianos fueron analizados utilizando análisis de la varianza (ANDEVA) con el programa BIOM (Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage,

Setauket, NY 117II USA) previa realización del test de homogeneidad de varianza y se efectuaron transformaciones log 10. Todas las comparaciones se realizaron adoptando un nivel de significancia de 5% ( $p = 0,05$ ). El análisis estadístico utilizado para la identificación de las cepas y los sitios o las estaciones fue componentes principales utilizando el programa PAST (Hammer y Harper, 2005).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CONIFORMES TOTALES Y FECALES

No se detectó la presencia de coliformes totales y coliformes fecales en ninguna de las muestras de agua de mar de los tres sitios. Caleta Olivia tiene muy poca cantidad de habitantes, y si bien sus cloacas desaguan al mar, éste tiene la capacidad de depurar rápidamente este tipo de contaminación. También hay que tener en cuenta que los microorganismos investigados (en especial los patógenos), son muy susceptibles a la salinidad y los factores ambientales, lo que dificulta mucho su recuperación (Rozen y Belkin, 2001). Por otro lado, solo se estudiaron los microorganismos patógenos en las muestras de agua y no en los sedimentos, en donde es posible que los mismos puedan desarrollarse asociados a la superficie de las partículas que lo componen.

### RECUENTOS BACTERIANOS

En la tabla 1 se indican los recuentos de bacterias oligotróficas, heterotróficas y de las que utilizan hidrocarburos.

BBR	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
M-1	0,03	0,32	0,02	0,61
M-2	0,81	8,3	0,39	0,89
M-3	0,4	1,86	0,02	0,92
S-1	0,7	6	0	4,7
S-2	156	580	0,8	22,3
S-3	17,3	35,2	24,9	0,4
<b>BRN</b>				
M-1	0,05	0,17	0,5	1,94
M-2	0,89	9,8	0,32	1,73
M-3	0,55	0,2	0,32	0,3
S-1	27,9	1000	0,6	19,3
S-2	225	730	4	41
S-3	9,5	40	24,8	1,4
<b>MBM-PGO</b>				
M-1	0,28	0,04	0,92	0,66
M-2	0,01	0,7	16,3	7,6
M-3	0,61	2,09	5,6	0,06
S-1	20,2	321	14,3	20,5
S-2	2,94	3,02	0,36	0,31
S-3	16,9	5,4	0,9	1

Tabla 1. Recuentos bacterianos en los medios MBM -PGO, BBR y BRN.  $10^{+03}$  UFC/g para los sedimentos (S); UFC/mL para el agua de mar (M); SD sin desarrollo.

Los tres sitios de muestreo poseen grava mediana o gruesa de similar gravimetría. Es por esto que los resultados de los recuentos en los medios de cultivo utilizados muestran diferencias significativas entre muestras de sedimento y de agua ( $p<0,05$ ), sin existir diferencia significativa entre las diferentes estaciones del año en un mismo sitio ( $p>0,05$ ) (Tabla 1).

El desarrollo de las bacterias en las placas fue lento y se estabilizó en el día 19, las bacterias marinas son de lento desarrollo, la tasa de crecimiento es de  $0,0004 - 0,01\text{h}^{-1}$  en agua fría (Hagström *et ál.*, 1984) aunque estos valores dependen de la temperatura y llegan a  $0,02 - 0,5\text{ h}^{-1}$  (Zweifel *et ál.*, 1995).

Los recuentos bacterianos obtenidos en las muestras de agua de mar son menores a los de los sedimentos, concordando con lo propuesto por Süss *et ál.*, 2004, que esto se debe al soporte que dan a los microorganismos los distintos tipos de partículas que forman los mismos. El orden de los recuentos en los medios de cultivo BBR y BRN está en concordancia con los encontrados para bacterias heterótrofas por Zweifel y Hagström, 1995, Mohamed *et ál.*, 2005 y Stabili y Cavallo, 2004, para el agua del Mar Báltico, del Mar del Norte, de la costa de Aqaba y el sur del Adriático. Los recuentos bacterianos realizados en placa son menores a los resultados obtenidos por recuento por microscopía utilizando DAPI, aunque Zweifel y Hagström, 1995, encontraron una diferencia de  $5,8 \times 10^3 \text{ cel/mL}$  entre ambos. Las bacterias cultivables son una fracción muy pequeña de las bacterias presentes, alrededor del 1% del total (Button *et ál.*, 1993; Douglas *et ál.*, 1987), esto se debe a que gran parte de los microorganismos permanecen latentes o inactivos y sólo una pequeña porción está activa (Zweifel y Hagström, 1994) o a requerimientos especiales de luz, presión o relaciones entre los integrantes de la comunidad bacteria que no se encuentran en los medios de cultivo utilizados para el aislamiento

De los treinta y seis sedimentos sembrados, solo en cuatro casos el número de bacterias provenientes de agua de mar superó a las provenientes de sedimento. Esto se observó en el medio MMPGO en los sitios 2 y 3 en otoño y solo en el sitio 2 en invierno, también ocurrió en el medio BBR para el sitio 3 en invierno. En los otros casos las poblaciones presentes en sedimento superaron a las presentes en agua de 1,2 a 8.000 veces.

Las relaciones numéricas entre los tres grupos estudiados obtenidos a partir de la tabla 1 indican que las bacterias heterótrofas (BRN) constituyen un porcentaje variable frente a las oligotróficas (BBR) que van desde un 0,6% a un 182% en sedimento y de un 4 a un 930% en agua de mar, lo que indica que no hay una relación entre bacterias cultivables presentes en el agua de mar y sedimento bañado por esa misma agua.

El número de bacterias que utilizan hidrocarburos fue comparado con los otros dos grupos estudiados, heterótrofas y oligotróficas, en ambos casos los porcentajes fueron muy variables lo que indica que hay gran cantidad de bacterias que crecen con hidrocarburos y no tienen la capacidad de formar colonias visibles en los otros dos medios utilizados. En el caso del medio BRN, esto se reflejó en 10 muestras de las 24 que se compararon (que corresponden a las 4 estaciones del año en los tres puntos de toma de muestra para de sedimento y agua de mar), siendo en dos casos 280 veces más abundantes. En el caso de la comparación de los medio MMPGO/BBR, fueron 15 veces más abundantes las primeras que las segundas, siendo un caso 50 veces más que las que desarrollaron en BBR.

#### IDENTIFICACIÓN DE CEPAS AISLADAS DE LOS RECUENTOS

De las diferentes placas de recuento realizadas en las cuatro estaciones del año, se aislaron 403 cepas bacterianas para su posterior identificación por ácidos grasos de membrana. De ellas, 256 presentaron un índice de similitud (SI) SI > 0,3, de estas sólo 172 mostraron un SI > 0,5 distribuidas en 32 géneros y 50 especies. El 36% de las cepas no se identificaron, debido a que muchas de las ellas no figuran en la base de datos del programa. Si bien en algunas cepas, el programa indicaba un nombre, no cumplía con los requisitos para considerarlas identificadas, también puede deberse a que son cultivos atípicos según Brown y Leff, 1996. Estos resultados indican la existencia de una diversidad de microorganismos cultivables aun mayor, que no se puede identificar en la base de datos utilizada (última de MIDI correspondiente al año 2006). El fenograma de todas las cepas, datos no mostrados por el tamaño del gráfico, no mostró cepas que sean iguales, representando esto una gran biodiversidad entre los microorganismos que desarrollaron en los medios de cultivo utilizados.

La comparación de todas la cepas mediante análisis de agrupamiento mostró que las no identificadas eran diferentes entre si, por lo que la biodiversidad de estos cultivos es mayor que la que se infiere de los géneros y especies obtenidos (datos no mostrado). El género que se presentó con más frecuencia, Tabla 2, fue *Pseudoalteromonas* (*Pseudoalteromona* sp. 30%, *P. nifraciens* 53% y *P. tetratenoides* 17%) con el 28%, seguida de *Pseudomonas* (Ps sp. 15%, *Ps huttiensis* 5%, *Ps pertucinogena* 2.5%, *Ps stutzeri* 2.5%, *Ps pseudoalcaligenes* 75%) con el 19%, ambos géneros son Gram negativos. En un estudio realizado por Stabili y Cavallo, 2004, en el sur del Adriático, identificaron los géneros *Aeromonas* y *Cytophago*, estos no se hallaron en nuestro trabajo, pero si hubo coincidencia con el resto de los géneros encontrados, solo con diferencias en los porcentajes de recuperación que podría deberse a las diferencias geográficas y ambientales y al método de identificación utilizado.

Géneros	%	Géneros	%
<i>Arthrobacter</i>	0,48	<i>Brevibacterium</i>	1,44
<i>Clavibacter</i>	0,48	<i>Neisseria</i>	1,44
<i>Corynebacterium</i>	0,48	<i>Kocuria</i>	1,91
<i>Dietzia</i>	0,48	<i>Vibrio</i>	1,91
<i>Escherichia</i>	0,48	<i>Zobellia</i>	1,91
<i>Flavobacterium</i>	0,48	<i>Shewanella</i>	2,39
<i>Lechevalieria</i>	0,48	<i>Microbacterium</i>	3,35
<i>Methylobacterium</i>	0,48	<i>Micrococcus</i>	3,35
<i>Nocardiooides</i>	0,48	<i>Rhodobacter</i>	3,35
<i>Salmonella</i>	0,48	<i>Photobacterium</i>	3,83
<i>Xanthobacter</i>	0,48	<i>Sphingomonas</i>	3,83
<i>Acinetobacter</i>	0,96	<i>Psychrobacter</i>	4,31
<i>Brevundimonas</i>	0,96	<i>Staphylococcus</i>	4,31
<i>Curtobacterium</i>	0,96	<i>Bacillus</i>	4,78
<i>Paenibacillus</i>	0,96	<i>Pseudomonas</i>	19,14
<i>Rhodovulum</i>	0,96	<i>Pseudoalteromonas</i>	28,71

Tabla 2. Porcentaje de los géneros de las 172 cepas identificadas por el sistema Sherlock -MIDI.

La distribución de las cepas identificadas en los sitios de muestreo se encuentra en la figura 2. Las tres muestras de agua se distribuyeron juntas y asociadas a *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas*, que también fueron las cepas mayoritariamente identificadas, ambas son gamma proteobacterias Gram negativas y poseen buen desarrollo en medios líquidos. *Pseudomonas* posee una gran versatilidad metabólica y juega un rol importante en la mineralización de compuestos orgánicos y en el ciclo del nitrógeno (Eckford et ál., 2002). Se las encuentra en agua de mar, sedimentos, fitoplancton (Nair y Simidu, 1987). También posee una capacidad excelente de desarrollo en medios líquidos y de crecimiento rápido cuando las condiciones son favorables. Su capacidad de utilizar hidrocarburos es ampliamente conocida. Son frecuentemente aisladas de suelos patagónicos contaminados con hidrocarburos (Pucci y Pucci, 2003; Vacca et ál., 2002). El género *Pseudoalteromonas*, constituye el 28% de los aislamientos que se observan en medios marinos y posee capacidad de utilizar hidrocarburos; este género está relacionado con *Alteromonas* y *Shewanellas*, todas ellas Gamma protobacterias heterótrofas marinas (Ivanova et ál., 2004). *Shewanella* ha sido estudiada en la última década por poseer un importante rol en el cometabolismo durante la biorremediación de compuestos halogenados, petróleo y reducción de manganeso y óxido de hierro, también son conocidas por su habilidad de producir ácidos grasos poliinsaturados (Russell y Nichols, 1999). Estas bacterias están asociadas al agua de mar en los tres sitios estudiados (Fig. 2).

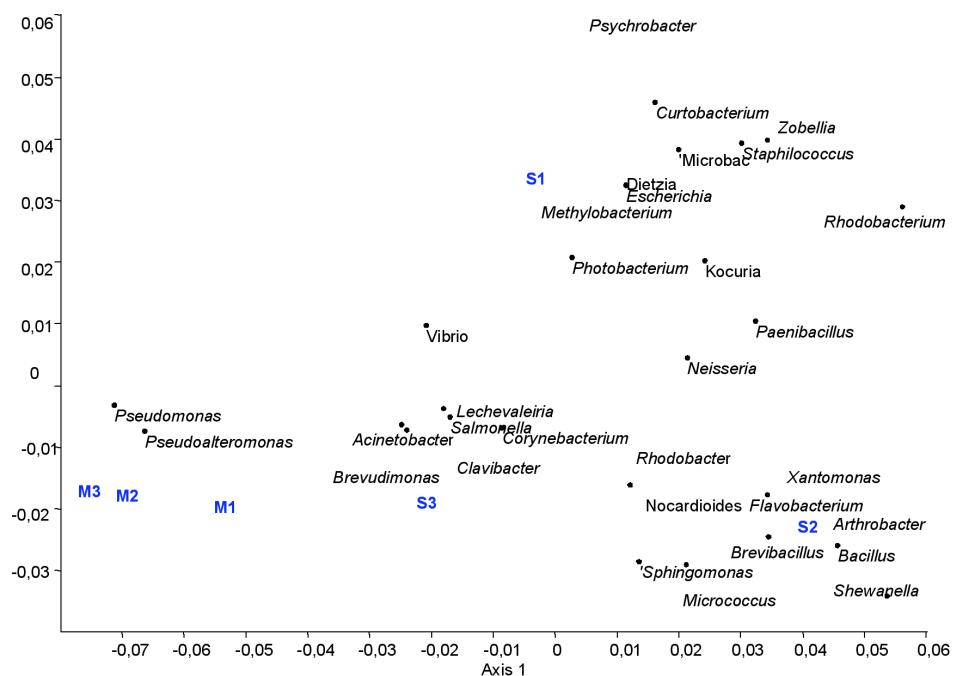


Figura 2. Análisis de componentes principales de los géneros bacterianos identificados y las muestras de agua y sedimentos por los sitios muestreados de la costa de Caleta Olivia, Ptagonia, Argentina.

En el análisis de ordenamiento (Fig. 2) las muestras de agua de mar se encuentran asociadas a *Alteromonas* y *Pseudoalteromonas*. El sedimento S1 se encuentra asociado a los géneros como *Psychrobacter*, *Zobellia*, *Curtobacterium*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Dietzia*, *Escherichia* y *Photobacterium*. El sedimento S2 se asocia a *Xantomonas*, *Bacillus*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Brevibacillus*, *Nocardioides*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter* *Micrococcus*. El sedimento S3 a *Brevundimonas*, *Clavibacter*, *Acinetobacter* *Coryne bacterium* y *Lechvaleira*. Este análisis indica una baja correlación entre lo encontrado en agua de mar y el sedimento que es bañado por la misma y que la población de cada sedimento adquiere características propias en cuanto a los géneros cultivables dominantes.

El análisis de ordenamiento entre los géneros y las estaciones evidencia que el otoño y el verano poseen la mayor concentración de géneros recuperados, consecuencia de una temperatura más óptima para los microorganismos (Fig. 3). La primavera está asociada a pocos géneros, *Photobacterium*, *Dietzia* y *Brevundimonas*. El invierno es la estación que más se aleja del grupo y comparte tres géneros bacterianos con el otoño. El género *Psychrobacter* está alejado de todos, estando más relacionado al invierno, siendo esto coincidente con las características térmicas del mismo. En el extremo opuesto está *Pseudomonas* asociada con el verano. La mayoría de las cepas mencionadas han sido indicadas por varios autores como pertenecientes al grupo de microorganismos que utilizan hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

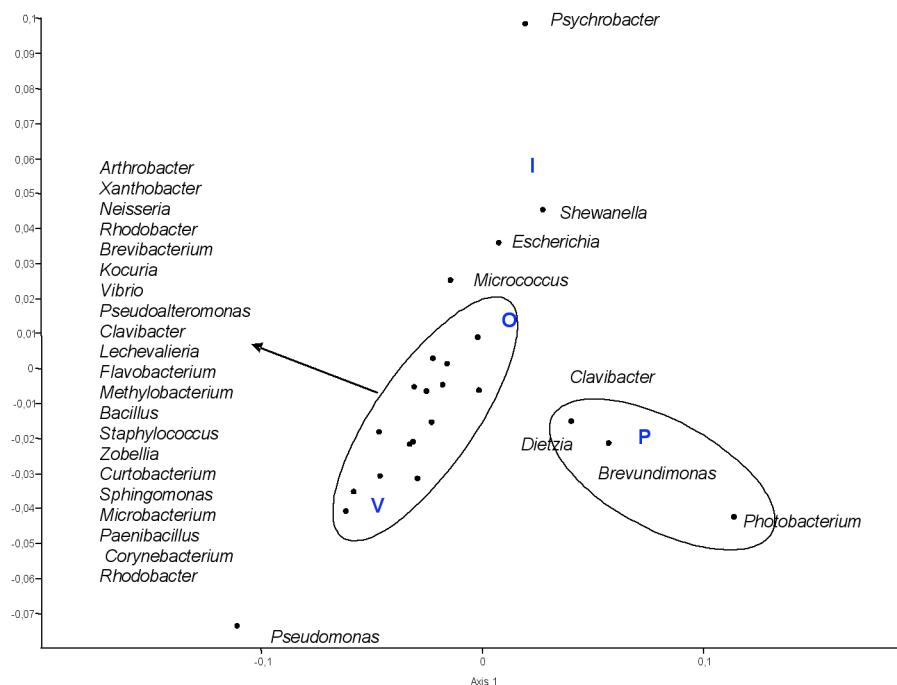


Figura 3 Análisis de componentes principales de los géneros bacterianos identificados y las cuatro estaciones anuales en que se tomaron las muestras de la costa de Caleta Olivia, Patagonia, Argentina.

Las cepas identificadas son las que se hallan frecuentemente en la bibliografía en el tema de agua de mar. Se encontraron géneros que son citados como degradadores de hidrocarburos, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas*. (Harayama et ál., 2004; Sus et ál., 2004; De Marco et ál. 2004; Bundy et ál. 2004; Mills et ál., 2003; Hua, 2006; Mukherji et ál., 2004)

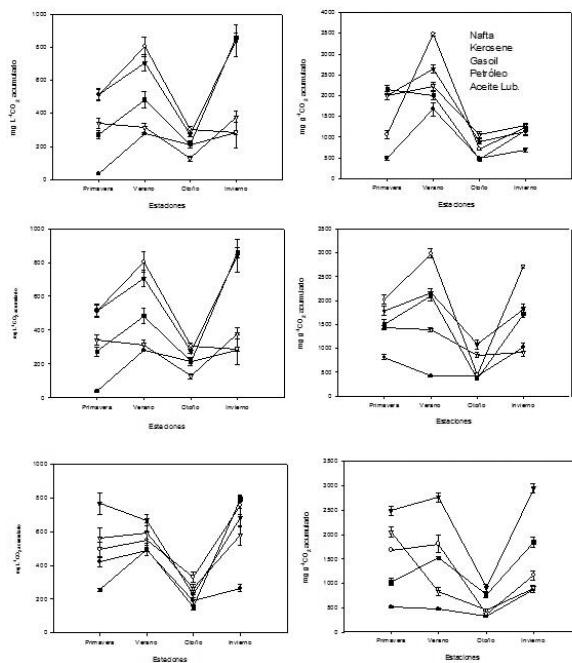


Figura 4. Acumulación de dióxido de carbono hasta el día 56. Para los cinco hidrocarburos nafta, kerosene, gasoil, petróleo y aceite lubricante. Las figuras a, c, e corresponden a las muestras de agua de los sitio 1, 2 y 3 respectivamente y las figuras b, d, y f corresponden a las muestras de sedimento de los sitios 1,2 y 3 respectivamente.

La mineralización, determinada por la acumulación de CO<sub>2</sub> (Fig. 4), fue llevada a cabo con fertilización con fuentes de nitrógeno y fósforo para que actúen positivamente sobre la biodegradación (Head et ál., 1999). La buena mineralización de los hidrocarburos en los sedimentos se debe a que estos son mejores soportes para los hidrocarburos y los microorganismos, favoreciendo su utilización y la mayor carga bacteriana en los mismos (Stoeck et ál., 2002). Las mineralizaciones obtenidas en estos sedimentos marinos son similares a las que se obtuvieron en suelos de la Patagonia utilizados en *landfarming* (Riis et ál., 2002). Los valores en agua de mar fueron menores, influenciados por la hidrofobicidad de los hidrocarburos, que limitan la utilización de estos últimos por parte de las bacterias. La mineralización de los hidrocarburos destilados de petróleo estudiados en medio líquido favorece a los microorganismos de rápido desarrollo como *Pseudomonas* (Atlas y Bartha, 2003). En general el otoño produjo una disminución en la

acumulación de CO<sub>2</sub> retomando a valores superiores en invierno, esto puede ser debido a una adaptación a las temperaturas inferiores y una vez adaptada la comunidad es capaz de volver a utilizar los hidrocarburos con una buena acumulación de CO<sub>2</sub>. Lo mismo ocurrió en primavera, pero en menor escala ya que el aumento de la temperatura siempre favorece a los microorganismos en estas latitudes.

### CONCLUSIONES

La acumulación de dióxido de carbono mostró que la comunidad bacteriana presente en la costa de Caleta Olivia es capaz de crecer utilizando los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía. Los géneros y especies identificadas (*Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Dietzia Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas*) son reconocidos degradadores de hidrocarburos.

Las relaciones observadas entre las 48 poblaciones bacterianas estudiadas por aislamiento e identificación, presentes en cada uno de los sitios, estaciones del año, agua y sedimento indican gran variabilidad metabólica de sus componentes y que con la utilización de medios de cultivo oligotróficos y heterotróficos no es suficiente para obtener un buen conocimiento de la totalidad de las poblaciones cultivables existentes.

### AGRADECIMIENTOS

A PNUD ARG/02/018 - Donación GEF N.º 28.385-AR por el financiamiento y al personal técnico del laboratorio CEIMA.

### BIBLIOGRAFÍA

- ATLAS RM, BARTHA RB. Ecología microbiana y microbiología ambiental Addison Wesley (eds) 2003;8:279-327.
- BARTHA R. Effects of environments Parameters on the biodegradation of Oil Sludge. Applied Env Microbiol. 1979;37:729-239.
- BROWN BJ, LEFF LG. Comparison of fatty methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for Identification of Aquatic Bacteria. Appl Environ Microbiol. 1996;62:2183-2185.
- BUNDY JG, PATON GI, CAMPBELL CD. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. Soil Biol Biochem. 2004;36:1149-1159.
- BUTTON DK, SCHUT F, QUANG P, MARTIN R, ROBERTSON BR. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. Appl Environ Microbiol. 1993;59:881-891.
- DE MARCO P, PACHECO CC, FIGUEIREDO AR, MORADAS-FERREIRA P. Novel pollutant- resistant methylotrophic bacteria for the use on bioremediation. FEMS Microbiol Lett. 2004;234:75-80.
- DOUGLAS DJ, NOVITSKY JA, FOURNIER RO. Microautoradiography- based enumeration of bacteria with estimates of thymidine-specific growth and production rates. Mar Ecol Pro Ser. 1987;36:91-99.

- ECKFORD R, COOK F, SAUL D, AISLABIE J, FOGHT J. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68:5181-5185.
- HAGSTRÖM Å, LARSSON U, HÖRSTEDT P, NORMARK S. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979;37:805-812.
- HAMMER O, HARPER DAT. Paleontological Statistics version 1.34 disponible en [www.folkuio.no/ohammer/past](http://www.folkuio.no/ohammer/past). 2005.
- HARAYAMA S, KASAI Y, HARA A. Microbial communities in oil contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:205-214.
- HEAD IM, SWANNELL RP. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;10: 234-239.
- HUAJ. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre spill application strategy. *Ocean Eng.* 2006;33:152-167.
- IVANOVA EP, FLAVIER S, CHRISTEN R. 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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1773-1788.
- MIDI. MIS Operating manual. 2005. [www.midi-inc.com](http://www.midi-inc.com)
- MILLS HJ, HODGES C, WILSON K, MACDONALD IR, SOBECKY PA. Microbial diversity in sediments associated with surface breaching gas hydrate mound in the Gula of Mexico. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003;46:39-52.
- MOHAMED A, SHENAWY EL, FARAG AM. Spatial and temporal variability of saprophytic and water quality bacteria along the coast of Aqaba, Suez gulfs and red sea-Egypt Egypt. *J Biotechnol.* 2005;31:157-162.
- MUKHERJI S, JAGEDEVAN S, MOHOPATRA G, VAINAS V. Biodegradation of diesel oil an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity o fan oil field. *Bioresour Technol.* 2004;95:281-286.
- NAIR S, SIMIDU S. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl Environ Microb.* 1987;53:2957-2962.
- PUCCI GN, PUCCI OH. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburo previamente sometidas a landfarming. *Rev Argent Microbiol.* 2003;35:62-68.
- PUCCI GN, ACUÑA AJ, LLANES ML, TIEDEMANN MC y PUCCI OH. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Rev boil Mar oceanogr.* 2009;44:49-58.
- RIIS V, BABEL W, PUCCI OH. Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere.* 2002;49:559-568.
- ROZEN Y, BELKIN S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25:513-529.
- RUSSELL NJ, NICHOLS DS. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria a dogma Rewritten. *Microbiology.* 1999;145:767-779.
- STABILI L, CAVALLO RS. Biodiversity of culturable heterotrophic bacteria in the Southern Adriatic Sea Italian coastal waters. *Sci Mar.* 2004;68:31-41.
- STOECKT, KRÖNCKE I, DUINEVELD G, PALOJÄRVI A. Phospholipid fatty acid

---

profiles at depositional and non-depositional sites in the north sea. *Mar Ecol Prog Ser* 2002;241:57-70.

SÜSS J, ENCELEN S, CYPIONKA H, SASS H. Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation depend methods. *Microb Ecol*. 2004;51:109-121.

VACCA GS, KIESEL B, WÜNSCHE L, PUCCI OH. Análisis de genes catabólicos de hidrocarburos aromáticos en cepas aisladas de suelos de la Patagonia. *Rev Argent Microbiol*. 2002;34:138-149.

ZWEIFEL U, HAGSTRÖM Å. Total Counts of Marine Bacteria include a Large Fraction of Non-Nucleoid-Containing Bacteria (Ghosts) *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:2180-2185.

ZWEIFEL UL, HAGSTRÖM Å. Marine bacteria: dead, alive, or dormant? *EOS, Trans., AGU*. 1994;75:28.

ZWEIFEL UL, WIKNER J, HAGSTRÖM Å, LUNDBERG E, NORRMAN B. Dynamics of dissolved organic carbon in a coastal ecosystem. *Limnol Oceanogr*. 1995;40:299-305.