



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Dr. Eduardo Valenzuela F.  
Instituto de Microbiología  
Facultad de Ciencias

**“COMPARACIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE BACTERIAS CROMÓGENAS  
AISLADAS DE DOS CUERPOS DE AGUA DE LA PROVINCIA DE VALDIVIA”**

**Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al Grado de  
Licenciado en Ciencias Biológicas.**

**KATY EUGENIA FUENZALIDA MORA**

**Valdivia – Chile**

**2006**

*Con mucho afecto dedico ésta tesis a mis padres y hermano por su entrega, apoyo y cariño.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al proyecto FONDECYT 1040913 por haber financiado mi tesis.

Agradezco al profesor Dr. Eduardo Valenzuela F. por su entrega incondicional de conocimiento y apoyo.

Agradezco a la Directora de la Escuela de Ciencias Dr. Gladys Ruiz D. por confiar en mi en el transcurso de la carrera.

Agradezco al Instituto de Microbiología por haberme permitido realizar el proyecto de tesis en sus laboratorios.

Agradezco a mis amigas Araceli, Caro, Naty, Sandra, Loreto por brindarme su compañerismo, alegría y apoyo en los momentos que lo necesité.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

		Pág.
1.	RESUMEN	1
	SUMARY	2
2.	INTRODUCCION	3
3.	MATERIALES Y METODOS	10
3.1	MATERIALES	10
3.1.1	Biológico y reactivos	10
3.1.2	Equipos y otros	10
3.2	MÉTODOS	11
3.2.1	Lugar de estudio	11
3.2.2	Recolección de muestras de agua y sedimentos	12
3.2.3	Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas sicrofílas viables desde muestras de agua y sedimento y aislamiento de bacterias pigmentadas.	13
3.2.4	Determinación taxonómica de cultivos bacterianos pigmentados hasta el rango género	14
3.2.5	Determinación de parámetros físicos y químicos en muestras de agua y sedimento	19
3.2.5.1	Temperatura	19
3.2.5.2	pH	19
3.2.5.3	Salinidad	20
3.2.6	Parámetros climáticos del lugar de estudio	20

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas psicrófilas viables desde muestras de agua y sedimento dulce y salado	21
<b>4.2</b>	Recuento de poblaciones bacterianas pigmentadas desde muestras de agua dulce y salada	22
<b>4.3</b>	Taxonomía de bacterias pigmentadas de agua y sedimento dulce y salado	24
<b>4.3.1</b>	Taxonomía de bacterias pigmentadas desde muestras de agua dulce y salada	24
<b>4.3.2</b>	Taxonomía de bacterias pigmentadas desde muestras de sedimento dulce y salado	27
<b>4.3.3</b>	Características de las taxas determinadas	30
<b>4.4</b>	Poblaciones bacterianas pigmentadas de muestras de agua dulce y salada de acuerdo a su relación con parámetros físicos y químicos	34
<b>4.4.1</b>	Temperatura	37
<b>4.4.2</b>	pH	37
<b>4.4.3</b>	Salinidad	38
<b>4.4.4</b>	Luminosidad	38
<b>4.5</b>	Poblaciones bacterianas pigmentadas de muestras de sedimento dulce y salado de acuerdo a su relación con parámetros físicos y químicos	39
<b>4.5.1</b>	Temperatura	42
<b>4.5.2</b>	pH	42

<b>4.5.3</b>	Salinidad	43
<b>4.5.4</b>	Luminosidad	43
<b>5.</b>	DISCUSIÓN	45
<b>5.1</b>	Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas psicrófilas viables desde muestras de agua y sedimento dulce y salado	45
<b>5.2</b>	Recuento de poblaciones bacterianas pigmentadas desde muestras de agua y sedimento dulce y salado	47
<b>5.3</b>	Taxonomía de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de agua dulce y salada	48
<b>5.4</b>	Taxonomía de bacterias pigmentadas desde muestras de sedimento dulce y salado	51
<b>6.</b>	CONCLUSIONES	53
<b>7.</b>	LITERATURA CITADA	54
<b>8.</b>	ANEXOS	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1.</b>	Ubicación de los sitios de muestreo	12
<b>Figura 2.</b>	Población bacteriana heterótrofa psicrófila viable (2A), de agua y sedimentos dulce y (2B) de agua y sedimento salados determinados en las épocas de muestreo	21
<b>Figura 3.</b>	Población bacteriana pigmentada de agua y sedimento dulce (3A) y (3B) de agua y sedimento salado determinados en las épocas de muestreo	23
<b>Figura 4.</b>	Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de agua salada, muestreo de invierno	24
<b>Figura 5.</b>	Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de agua dulce, muestreo de primavera	25
<b>Figura 6.</b>	Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de agua dulce, muestreo de verano	25
<b>Figura 7.</b>	Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de sedimento. (D) dulce; (E) salado, para el muestreo de invierno	27
<b>Figura 8.</b>	Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de sedimento. (F) dulce; (G) salado, para el muestreo de primavera	28
<b>Figura 9.</b>	Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de sedimento. (H) dulce; (I) salado, para el muestreo de verano	29

<b>Figura 10.</b>	Morfología de bacterias pigmentadas aisladas desde agua y sedimento dulce y salado	33
<b>Figura 11 A.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo a la temperatura	34
<b>Figura 11 B.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo al pH	35
<b>Figura 11 C.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo a la salinidad	35
<b>Figura 11 D.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo a la luminosidad (PAR)	36
<b>Figura 11 E.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo a la luminosidad (UVB1 y UVB2)	36
<b>Figura 12 A.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de sedimento dulce y salado de acuerdo a la temperatura	39
<b>Figura 12 B.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de sedimento dulce y salado de acuerdo al pH	40
<b>Figura 12 C.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de sedimento dulce y salado de acuerdo a la salinidad	40
<b>Figura 12 D.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de sedimento dulce y salado de acuerdo a la luminosidad (PAR)	41
<b>Figura 12 E.</b>	Variaciones de poblaciones bacterianas pigmentadas de sedimento dulce y salado de acuerdo a la luminosidad (UVB1 y UVB2).	41



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
<b>ANEXO 1.</b>	
Preparación de medios de cultivos y reactivos	61
<b>ANEXO 2.</b>	
<b>Tabla 1.</b> Parámetros físico – químicos, en muestras de agua y sedimento dulce y salado para la época de invierno	65
<b>Tabla 2.</b> Parámetros físico – químicos, en muestras de agua y sedimento dulce y salado para la época de primavera	65
<b>Tabla 3.</b> Parámetros físico – químicos, en muestras de agua y sedimento dulce y salado para la época de verano	66
<b>Tabla 4.</b> Parámetros climáticos del lugar de estudio	66
<b>ANEXO 3.</b>	
<b>Tabla 1.</b> Población bacteriana heterótrofa psicrófila viable ( ufc/mL o g de muestra), por periodo de muestreo	67
<b>Tabla 2.</b> Población de bacterias pigmentadas ( ufc/ml o g de muestra), por periodo de muestreo	67
<b>Tabla 3.</b> Número de géneros identificados a partir de muestras de agua y sedimento dulce y salado para los tres periodos de muestreo	68

## 1. RESUMEN

Existen bacterias acuáticas que llaman la atención por su coloración característica, debido a que presentan pigmentos para protegerse de la radiación de la luz. La presencia de éstas bacterias cromógenas en cuerpos de agua y sedimento dulce y salados además podrían estar relacionado con factores físico – químicos. En el presente estudio las muestras de agua y sedimento dulce y salado se colectaron en la zona costera de Niebla, durante invierno, primavera y verano, se determinó cuali-cuantitativamente las bacterias pigmentadas y cuantitativamente las poblaciones bacterianas heterótrofas psicrófilas viables.

En los recuentos de poblaciones bacterianas pigmentadas se determinó que la mayor población bacteriana ( $700.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed.) se presenta en muestras de sedimento dulce (primavera), y la menor población ( $15 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed.) también se presentó en sedimento dulce (invierno). La flora bacteriana pigmentada predominante, durante las tres épocas de muestreo correspondió a Gram negativas, en su mayoría, del género *Alteromonas* (23.2%) y *Flexibacter* (21.2%), y en menor porcentaje del género *Chromobacterium* (3.9%). Los valores de temperatura, pH y salinidad en la época de invierno registraron mínimos, que se relacionan con un mayor número de bacterias pigmentadas ( $17.000.000 \times 10^3$  ufc  $mL^{-1}$ ) aisladas desde muestras de agua salada y ( $50.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed.) desde sedimento salado, relacionándose directamente con los parámetros físico y químicos del lugar de estudio. De acuerdo a los resultados, existe una mayor población de bacterias pigmentadas en muestras de sedimentos, esto se debería al aumento de temperatura que afecta principalmente a las zonas más superficiales del cuerpo de agua y favorecen al aumento de éstas bacterias cromógenas.

## SUMMARY

The exist aquatic bacteria that the attention by their characteristic coloring, due to that present pigments to be protected of the radiation of the light. The presence of these cromogens in bodies of water and salty and sweets sediment besides they would be able to be related to physical – chemical factors. In the presents study the samples of water and salty and sweet sediments were collected in the coastal zone of Niebla, during winter, spring and summer, was determined quali-quantitative the bacteria pigmented and quantitative the bacterial population heterotrophic psicrofiles viables.

In the recounts of bacterial populations pigmented was determined that bacterial the greater population ( $700.000 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1}\text{sed.}$ ) is presented in samples of sweet sediment (spring), and smaller population ( $15 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1}\text{sed.}$ ) also was presented in sweet sediment (winter). The bacterial flora pigmented predominat, during the three epochs of sampling corresponded to Gram negative, in its majority, of the kind *Alteromonas* (23.2%) and *Flexibacter* (21.2%), and in smaller percentage of the kind *Chromobacterium* (3.9%). The values of temperature, pH and salinity the epoch of winter registred minimums, that relate to a greater number of bacteria pigmented ( $17.000.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1}$ ) remote saltwater from samples and ( $50.000 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.}$ ) salty from sediment being related directly with the physical parameters and chemists of the place of study. According to the results, a greater population of bacteria exists pigmented in samples of salty sediment, this would be owed al increase of temperature that affects mainly to the most superficial zones of the body of water and they favor al increase of these bacteria cromogens.

## 2. INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de organismos acuáticos, que si bien conservan muchas semejanzas, a menudo difieren marcadamente en sus propiedades físicas y químicas. Los ambientes acuáticos típicos son los océanos, estuarios, marismas, lagos, estanques, ríos y manantiales (Madigan *et al*, 1998). Los océanos poseen la mayor riqueza filogenética sobre la tierra, presentando el mayor número de animales, plantas y microorganismos (Jensen & Fenical, 1994 citado por Mancilla, 2003) que interactúan y compiten por la disponibilidad de alimento; dentro de éste sistema las bacterias son las principales participantes en el flujo de la energía y la mineralización de la materia orgánica, la que tendrá que encontrarse en mayores concentraciones para que puedan satisfacer sus diversas funciones (Karl, 2002). Además contribuyen, sustancialmente, a la nutrición de otros niveles tróficos, tanto en la masa de agua como en el sedimento.

Dentro de éste sistema, el balneario de Niebla, situado en la X Región corresponde a una típica zona costera, recibe afluentes del río Valdivia, que presenta una superficie de 9.900 Km<sup>2</sup> y una longitud de 200 Km desde su nacimiento en territorio Argentino hasta su desembocadura en la bahía de Corral y Niebla ( Sánchez & Moralez, 2000). Esta zona de playas presenta un sedimento no consolidado ubicadas en la unión entre agua y tierra y generalmente están compuestas de arena, lodo o rocas. Esteros y lagunas costeras también se encuentran formando parte de éstas áreas, las que se caracterizan por ser sitios costeros donde las aguas continentales (“aguas dulces”) se mezclan gradualmente con aguas oceánicas, determinando la existencia de amplios gradientes de salinidad, temperatura y densidad (Silva, 2002).

Prácticamente no hay información publicada acerca de sus características oceanográficas e importancia en la productividad de ésta zona. Sin embargo, lentamente se ha ido incrementando el interés de realizar estudios científicos en ésta área, sobre todo en la preservación del ambiente natural y de todas las áreas de reserva con el fin de asegurar la conservación de las especies, las que sirven de sitios de refugio, reproducción, alimentación, desarrollo y crecimiento ( Stuardo *et al* 1993).

Chile tiene, proporcionalmente con relación a su superficie, el litoral más extenso y diversificado y una microbiota poco estudiada (Mancilla, 2003), pero en desarrollo. Resultados preliminares permiten dar a conocer las variaciones en la distribución de las comunidades bacterianas dentro del ambiente marino, como señala Madigan *et al.* (1998), las zonas de alta mar tienen una producción muy baja de bacterias, debido a que los nutrientes inorgánicos necesarios para el crecimiento están solamente presentes en bajas concentraciones. Por el contrario, las áreas oceánicas costeras, tienen una producción mas alta, ya que reciben de los ríos grandes aportes de nutrientes. Hay, sin embargo, algunas zonas de alta mar que presentan una gran concentración de bacterias, son las áreas donde los vientos y corrientes originan un intenso afloramiento del agua profunda del océano, llevando a la superficie nutrientes del fondo del mar.

Por el contrario, investigaciones hechas en cuerpos de agua dulce demuestran que existirían variaciones cuantitativas en la abundancia bacteriana, aumentando la concentración de estas desde la zona costera hacia la parte mas profunda (Schultz *et al* 2003). Esto refleja que la estabilidad y variabilidad de estos dos medio ambientes es distinta.

La actividad y abundancia de las bacterias acuáticas están a su vez afectadas por el ambiente físico y químico ( temperatura, pH, luz y salinidad), cuyos valores sean superiores o inferiores

a los óptimos, pueden alterar considerablemente el metabolismo, la forma celular y la reproducción de algunas especies (Madigan *et al*, 1998; Rheinheimer, 1987). Por ejemplo, muchas bacterias incoloras sufren una inhibición a causa de la luz, en cambio otras bacterias acuáticas y terrestres presentan pigmentos para protegerse de la irradiación de la luz, fenómeno que afecta del mismo modo a la mayor parte de las demás especies del fitoplancton, cuyas condiciones óptimas en verano no residen en la superficie, sino a unos metros de profundidad. Las bacterias pigmentadas, que contienen carotenoides, toleran muy bien la luz. En este caso, si la intensidad luminosa es normal, no se produce ninguna inhibición del crecimiento (Rheinheimer, 1987).

Estas bacterias que llaman la atención por su coloración característica, es debido a la pigmentación de las células. La capacidad de sintetizar sustancias coloreadas está determinada genéticamente y es por tanto característica de la especie (Schlegel, 1997). Los pigmentos son derivados de distintas clase de sustancias como: carotenoides (piocianina, iodina, indigoidina, prodigiosina, violaceína, fleixantofila, sarcinaxantina), colorantes fenácicos, pigmentos amarillos verdosos fluorescentes, pirroles, azaquinonas y antocianos. Algunos de estos pigmentos son empleados en los procesos de fotosíntesis. Bacterias acuáticas como las Cianobacterias realizan una fotosíntesis oxigenica, presentan clorofila a, ficobilinas y utilizan el agua como dador de hidrógeno, por su parte, otro grupo de bacterias acuáticas realizan una fotosíntesis anoxigenica, ellas requieren de oxigeno para su crecimiento y para la síntesis de bacterioclorofilas y carotenoides utilizando como dadores de hidrógeno compuestos reducidos del azufre o compuestos orgánicos (Beja *et al*, 2002), además pueden utilizar el tipo de

radiación infrarroja para la fotosíntesis (Ibáñez, 1998), dentro de estas últimas bacterias se encuentran las denominadas bacterias rojas y verdes.

Dentro de las bacterias que utilizan sus pigmentos para soportar de mejor forma la radiación predominan los tonos amarillos, naranja y rojo debido a la presencia de carotenoides, los que no solo tiene acción protectora, sino que también absorben luz con fines fotosintéticos y están implicados en la fototaxis durante la recepción de la luz (Schlegel, 1997).

Investigaciones bacteriológicas realizadas con motivo de la expedición internacional al Océano Indico, han demostrado que la participación porcentual de las bacterias pigmentadas en la zona saprófita del Golfo Pérsico, de profundidad relativamente escasa, es mayor que en el Omán, mucho más profundo. Esto podría ser también una consecuencia de los efectos de la luz, ya que la radiación solar aumenta el crecimiento y la productividad de cultivos bacterianos (De Lange *et al*, 2003), encontrando una relación evidente entre la irradiación solar y el número de flabobacterias pigmentadas en la Bahía de Narragansett de la costa atlántica americana. Las formas de pigmentación anaranjada abundan hasta alcanzar el máximo en la época de mayor iluminación; en cambio, las de pigmentación amarilla llegaban a él cuando la irradiación solar era mínima. Las investigaciones llevadas a cabo con cultivos puros de bacterias incoloras, amarillas y anaranjadas han puesto de relieve que la tasa de mortalidad, a causa de la luz, se reduce al aumentar la pigmentación.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la actividad bacteriana se reduce en forma significativa una vez que son expuestas a la radiación solar (Pausz & Herndl, 2002), esto quedó demostrado en experimentos realizados en laboratorio donde se expuso a bacterias

marinas a diversos rangos de radiación artificial. La radiación, por lo tanto, podría estar modificando cuali y cuantitativamente la comunidad bacteriana (Cormack, 2002).

El factor luz, por lo tanto está muy relacionado con la temperatura, dentro de los cuales pueden vivir los microorganismos entre márgenes muy diversos. Las condiciones de un medio acuático determinado puede ser favorable para ciertos microorganismos, multiplicándose en forma rápida en temperaturas estivales, en primavera y verano las poblaciones bacterianas presentan grandes incrementos en las superficies del agua (Egan & Floodgate, 1984), donde generalmente existe una mayor radiación, y desfavorables para otros, provocando su muerte casi inmediata. Por el contrario las bajas temperaturas invernales, hacen mas lento los procesos prolongando la supervivencia de las bacterias aumentando el número de éstas (Rheinheimer, 1987), hay que tomar en cuenta que la luz desciende en éstas épocas y que el número de bacterias es menos intensa.

Si bien las características físicas antes mencionadas son importantes en la concentración de bacterias pigmentadas, el pH y la salinidad también constituyen factores relevantes en el desarrollo de estos microorganismos. La mayoría de las bacterias pueden crecer dentro de un margen de pH de su medio, manteniendo al mismo tiempo su pH interno óptimo prácticamente constante (Ibáñez, 1998) pero generalmente las bacterias acuáticas crecen y se reproducen entre valores de pH que fluctúan entre 6.5 y 8.5, pueden encontrarse desviaciones de éstos valores, asociados a la época de floración del placton. Las grandes oscilaciones del pH pueden provocar alteraciones fisiológicas o morfológicas, como en las formas bacilares, que aumentan de tamaño y ostentan abultamientos y ramificaciones irregulares, pudiendo también afectar a la membrana y al transporte de solutos, e inhibiendo enzimas (Ibáñez, 1998). Las aguas al presentar un pH elevado tendrán un alto porcentaje de carbonatos,



bicarbonatos y sales, en tanto el pH bajo estará caracterizado por la disminución del contenido de nutrientes, lo que provoca que las bacterias tengan que adaptarse a los cambios bruscos en forma eficiente, por el contrario pueden morir.

Según Alcocer (2005), un papel preponderante en la distribución de las comunidades bacterianas juega la concentración salina en los ambientes acuáticos, las bacterias de éstas zonas, son capaces de habitar en un amplio intervalo de salinidades. Sus estudios han demostrado que muchos de éstos organismos se encuentran en la naturaleza en intervalos de salinidad más amplios que los determinados a través de los experimentos. Las comunidades acuáticas están formadas por especies eurihalinas, que toleran las frecuentes fluctuaciones de salinidad, y su estructura no sigue ningún patrón estacional, sino que responde a la irregularidad hidrológica (Quintana *et al*, 2004).

El aumento de la concentración de sal, perturba el mecanismo normal de reproducción, así, por ejemplo, algunas bacterias marinas, que en concentraciones normales de salinidad tienen forma bacilar, se hacen mucho más largas y filamentosas cuando la concentración salina supera el 50‰. Esto determina que la proporción relativamente alta de NaCl del agua de mar se ha traducido en la constitución de organismos fisiológicamente distintos para el agua dulce y la salada (Rheinheimer, 1987). Tras periodos de sequía, se acumula fósforo y se producen pérdidas de nitrógeno por desnitrificación limitando la producción primaria (Quintana *et al*, 2004).

Durante los meses de mayor precipitación pluvial (julio a octubre) existe una disminución en la salinidad hasta 10% (Romero *et al.*, 1985), pudiendo influir sobre todo en las características y concentraciones bacterianas, y por lo tanto las proporciones de bacterias cromógenas se ve afectada.

En base a los antecedentes antes comentados se plantea la siguiente hipótesis.

En muestras de agua dulce y salada de la zona costera de Valdivia – Chile, existen cuali y cuantitativamente un mayor número de bacterias cromógenas en diferentes estaciones del año versus las poblaciones bacterianas aisladas desde muestras de sedimento dulce y salado del mismo lugar.

Para aceptar o rechazar la hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar cuali y cuantitativamente las poblaciones bacterianas pigmentadas en muestras de agua y sedimento dulce recolectados en el estero de la plata (Valdivia) en distintas estaciones del año.
- Determinar cuali y cuantitativamente las poblaciones bacterianas en muestras de agua y sedimento salados recolectados en la playa chica de Niebla (Valdivia) en distintas estaciones del año.
- Relacionar las poblaciones bacterianas pigmentadas de acuerdo al sitio de colecta, tipo de muestra y época de muestreo.
- Relacionar las poblaciones de bacterias heterótrofas psicrófilas viables y bacterias pigmentadas con el pH, temperatura y salinidad.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 MATERIALES

**3.1.1 Biológico:** se utilizaron en total 540 cepas de bacterias, 180 aisladas desde muestras de agua y sedimento dulce ( Estero de la Plata) y 360 de agua y sedimento salado (Playa Chica), Valdivia. Además las cepas bacterianas controles *Pseudomona aeruginosa* y *Echerichia coli*.

**Reactivos:** los reactivos usados en la parte experimental se presentan ordenados alfabéticamente y se señala en paréntesis las abreviaturas usadas en el texto: agar-agar, agar celulosa, agar Hugh Leifson, agar nitrato, agar peptona al 2% (AP 2%), alcohol – acetona, cloruro de sodio (NaCl), extracto de carne, fucsina, gelatina, glucosa al 10%, lugol, medio Marine Broth, peptona, reactivo de Barrit: sol A: alfa naftol al 5% en alcohol etílico al 95%, sol B: KOH al 40%, reactivo de Kovacs: 50g de para- dimetilaminobenzaldehido, 750 mL de alcohol amílico y 250 mL de HCl 5 N, sol B: 0.5 g de alfa naftilamina disuelto en 100 mL de ácido acético 5 N, reactivo Rojo Metilo, safranina al 0.25%, tetrametil- para- fenilendiamina al 0.5%, violeta de genciana, verde de malaquita al 7.6%.

**3.1.2 Equipos:** agitador orbital Lab-Line, autoclave Orsa, balanza analítica Precisa 200 c, balanza Hanson 1460, cámara de cultivo Kottermann, cámara de luz ultravioleta Siemens, cámara fría Eurofrigo, lupa esterocópica Carl Zeiss, microscopio óptico Carl Zeiss, refrigerador Trotter, salinómetro (hand refractometer) Atago S/Mill 0-100 ‰, termómetro Precision, vortex manual modelo K-550-GE ( 220 y 50 Hz ).

**Otros:** aceite de inmersión Carl Zeiss, agua destilada estéril, agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), alcohol 90°, algodón cardet, asa de siembra, bolsas nylon de 29 x 23 cm, botellas de vidrio estériles de 250 mL, cuchara, filtros de celulosa de 0.2 um, lápiz marcador, matraz Erlenmeyer de 100, 500 y 1000 mL, mechero, microondas, muestras de agua (dulce y salada), muestras de sedimento (dulce y salado), olla a presión Megafensa, papel filtro Whatman, papel indicador de pH Merck, pipetas volumétricas de 1,5 y 10 mL, pipetas Pasteur, placas Petri, porta objetos (75 x 25mm), probetas de 500 y 1000 mL, rastrillo de siembra, tubos de ensayo de 18 mm de diámetro, tubos Venogel, vaselina líquida, vasos precipitados de 200 y 500mL.

### **3.2 Métodos:**

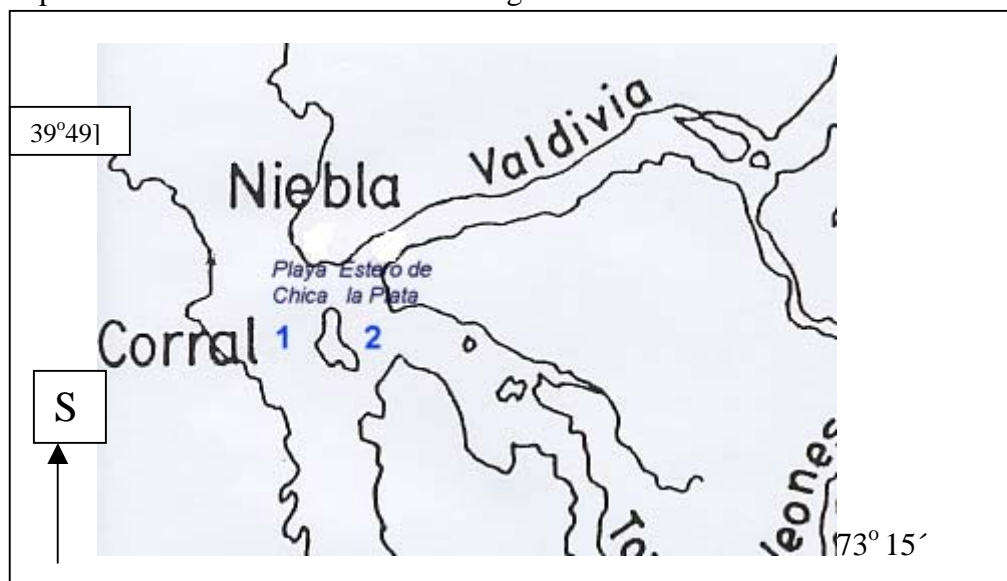
**3.2.1 Lugar de estudio:** Los lugares de estudio Estero de la Plata y Playa Chica se encuentran ubicados en el balneario de Niebla (39° 49' S y 73° 15' W) a 17 Km de la ciudad de Valdivia X región-Chile.

El Estero de la Plata proviene desde drenajes terrestres y desemboca en el Océano Pacífico. El agua de éste estero es dulce y presenta temperaturas de 12 a 14 °C (invierno y verano respectivamente) y el pH del agua varía entre 4.7 y 5.0. Por su parte la Playa Chica se ubica al sur del Estero de la Plata y tiene una extensión de 70 metros. El agua presenta temperaturas de 10 a 16 °C (invierno y verano respectivamente) y el pH del agua varía entre 5.5 a 6.0 y la salinidad entre 15 a 18 S ‰.

### 3.2.2 Recolección de muestras de agua y sedimento

La recolección de muestras de agua y sedimento dulce y salado se realizó durante los meses de Agosto (Invierno), Diciembre (Primavera) del 2004 y Marzo (Verano) del 2005 en la Playa Chica y hacia el norte en el Estero de la Plata en Niebla. (Fig.1).

En cada sector y época de muestreo se recolectaron en forma independiente las muestras de agua y sedimento como se indica a continuación: en botellas de vidrio estériles de 500 mL de capacidad, se recolectaron 6 muestras de agua (3 de agua dulce y 3 de agua salada) cada una de ellas de 100 mL, las muestras de sedimento (3 de sedimento dulce y 3 de sedimento salado) cada una de 10 g, recolectadas manualmente y se depositaron independientemente en bolsas plásticas. Cada muestra se rotuló con el nombre del sector de muestreo. Las muestras de agua y sedimentos se trasladaron al Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile para su inmediato análisis bacteriológico.



**FIGURA 1:** Ubicación de los sitios de muestreo. 1: Playa Chica. 2: Estero de la Plata.

### **3.2.3 Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas siccófilas viables desde muestras de agua y sedimento y aislamiento de bacterias pigmentadas.**

Cada muestra de agua se procesó individualmente mediante el método de las diluciones seriadas como se describe a continuación: de la muestra correspondiente con ayuda de una pipeta estéril se extrajeron 10 mL de agua y se depositaron en una botella que contenía 100 mL de agua destilada estéril (obteniendo una dilución  $10^{-1}$ ). A partir de la dilución  $10^{-1}$  se extrajo con una nueva pipeta estéril 1 mL y se depositó en un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, obteniéndose la dilución  $10^{-2}$ , a partir de este tubo previamente agitado y con ayuda de una nueva pipeta estéril se tomó 1 mL y se depositó en un nuevo tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, obteniéndose la dilución  $10^{-3}$ . Esta metodología se realizó hasta obtener una dilución  $10^{-7}$ , teniendo cada vez la precaución de ir agitando el tubo respectivo y usando una nueva pipeta estéril en cada ocasión. Cada una de las diluciones obtenidas se sembraron independientemente y por triplicado en los medios de cultivo: agar peptona con y sin adición de NaCl al 7% y medio Marine Broth, para lo cual con ayuda de una pipeta se extrajo 0.1 mL de la dilución respectiva y se depositó en la placa Petri que contenía el respectivo medio de cultivo, luego la muestra se diseminó sobre la superficie del agar con un rastrillo de siembra. Las placas sembradas se incubaron a 23 °C por 48 a 72 horas. Terminado el periodo de incubación se procedió en primer lugar a ojo desnudo a contar las colonias bacterianas totales y las colonias de bacterias cromógenas y calcular las poblaciones bacterianas respectivas. En segundo lugar se procedió a la obtención de los cultivos bacterianos puros, para lo cual se seleccionaron sólo colonias aisladas de bacterias pigmentadas, las que fueron sembradas en forma individual en tubos que contenían el mismo medio de cultivo utilizado para el aislamiento. Los tubos sembrados se incubaron a

23°C por 48 horas, luego de este período fueron almacenados a 5°C hasta realizar la identificación taxonómica de los cultivos bacterianos obtenidos.

Para el tratamiento de las muestras de sedimento la metodología utilizada fue la misma, excepto que se pesaron asépticamente 10 g de la muestra de sedimento respectiva y se realizaron las diluciones seriadas del mismo modo como fue detallado para las muestras de agua. Este procedimiento fue realizado hasta la dilución  $10^{-7}$ . Las diluciones obtenidas fueron sembradas e incubadas hasta la obtención de los cultivos bacterianos puros, de igual modo como se realizó con las muestras de agua.

#### **3.2.4 Determinación taxonómica de cultivos bacterianos pigmentados hasta el rango de género**

Cada una de las cepas de bacterias pigmentadas obtenidas como se señaló en el punto 3.2.3 fue replicada en tubos que contenían el mismo medio de cultivo usado para cepario. Luego de la incubación se realizó una caracterización macroscópica de las colonias de la cepa respectiva (color, forma, tamaño, etc). A continuación se comprobó la pureza del cultivo mediante una tinción de Gram de las cepas bacterianas en estudio, que también permitió establecer la morfología, agrupación y reacción al Gram. Para establecer el género al cual pertenece la cepa en estudio se realizaron las pruebas bioquímicas y tinciones establecidas en los esquemas de clasificación de Bergey's Manual of Determine Bacteriology (Holt *et al.*, 1994), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg y Holt, 1984) y Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Cowan *et al.*, 1974) que se señalan a continuación.

## Pruebas bioquímicas

- a) Ensayo de oxidación – fermentación de hidratos de carbono: mediante este ensayo se puede determinar la capacidad que poseen las bacterias en estudio para oxidar y/o fermentar un determinado hidrato de carbono.

Técnica: un inóculo de la cepa bacteriana en estudio se siembra por picadura en dos tubos que contienen agar Hugh Leifton adicionado del carbohidrato a investigar, uno de los tubos luego de ser sembrado se sella con vaselina líquida para dar las condiciones de anaerobiosis. Sembrados los tubos se incuban a 23°C por 48 horas, luego de este período se procede a la lectura. Una coloración amarilla del tubo no sellado y sellado significa que se ha producido fermentación del carbohidrato, en tanto que la coloración amarilla exclusivamente en el tubo no sellado significa que se a producido una oxidación del carbohidrato. Para el presente estudio se ensayó el hidrato de carbono glucosa.

- b) Hidrólisis de gelatina: esta prueba permite determinar la capacidad que poseen las bacterias en estudio para hidrolizar las proteínas.

Técnica: un inóculo de la cepa bacteriana en estudio se siembra por picadura en un tubo que contiene gelatina al 12%, tras lo cual los tubos se incuban a 23°C por 48 horas. Una reacción positiva se denota por la fluidización del medio de cultivo.

- c) Prueba de la catalasa: la catalasa es una enzima que presenta la mayoría de las bacterias aerobias, hidroliza el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$ .



Técnica: en un portaobjeto se deposita una pequeña cantidad del cultivo en estudio y luego se le adiciona una gota de  $H_2O_2$ . La reacción es positiva cuando se observa un desprendimiento de burbujas.

d) Prueba del indol: detecta la acción de la enzima triptofanasa presente en bacterias que degrada el aminoácido triptófano liberando el compuesto nitrogenado llamado indol.

Técnica: se inocula la bacteria en estudio en tubos que contienen caldo peptona. Una vez inoculado los tubos se incuban a  $23^\circ C$  por 24 horas y luego se detecta el indol agregando a los tubos 0.5 mL del reactivo de Kovacs. Una reacción positiva se traduce por la formación de un anillo color rojo - cereza en el menisco del tubo.

e) Prueba de la oxidasa: permite detectar la actividad del citocromo C, esta actividad se determina mediante la oxidación de un reactivo indicador como el tetra-metil-para-fenilendiamina y se traduce por un color que va desde el rosa al púrpura.

Técnica: sobre un papel filtro se deposita una pequeña cantidad de la bacteria en estudio y a continuación se depositan 2 gotas de la solución al 0.5% del reactivo tetra-metil-para-fenilendiamina (recién preparada en agua destilada). Una reacción positiva se traduce por una coloración rosada a violeta oscuro en la zona del papel en que fue depositado el inóculo bacteriano.

f) Prueba de reducción de nitratos: la reducción del nitrato a nitrito o nitrógeno es realizada por los microorganismos anaerobios facultativos, mediante una respiración anaerobia, en la cual el último aceptor de hidrógeno en la cadena respiratoria es el nitrato.

Técnica: sembrar por picadura una pequeña cantidad de la bacteria en estudio en un tubo que contiene agar nitrato semisólido e incubar los tubos sembrados a 23°C por 24 horas. Luego del periodo de incubación la reducción del nitrato se detecta agregando al contenido del tubo 0.5 mL de la solución A y B del reactivo nitrato. La prueba es positiva cuando el contenido del tubo se torna de color violeta a café ladrillo.

g) Prueba del Rojo Metilo: permite determinar si el microorganismo en estudio realiza una fermentación fórmica tipo ácido mixta.

Técnica: se siembra un inóculo de la bacteria en estudio en tubos que contienen caldo glucosado. Una vez sembrados los tubos se incuban a 23 °C por 24 horas y luego se detecta la producción de los ácidos orgánicos agregando a los tubos 10 gotas del reactivo de Rojo de Metilo. La reacción es positiva si el contenido del tubo se torna de color rojo.

h) Prueba de Voges Proskauer: permite determinar si el microorganismo realiza una fermentación fórmica tipo butinglicol, con predominio de productos neutros como butilenglicol, acetoína y pequeñas cantidades de ácidos orgánicos.

Técnica: se siembra un inóculo de la bacteria en estudio en tubos que contienen caldo glucosado. Una vez sembrados los tubos se incuban a 23°C por 24 horas y luego se detecta la producción de acetoína agregando al contenido de los tubos el reactivo de Barrit, 0.5 mL de la solución A y 0.2 mL de la solución B, agregado el reactivo, los tubos se dejan destapados por

10 minutos a temperatura ambiente. La prueba es positiva cuando el contenido del tubo se torna de color rosado.

### **Tinciones.**

a) Tinción de Gram: permite determinar la reacción al Gram de los microorganismos, según el tipo de pared celular que presentan. Además, se pueden determinar la morfología y agrupación que presentan las bacterias.

Técnica: en un porta objeto, extender y fijar una pequeña cantidad del microorganismo en estudio, luego teñir con violeta de genciana por 2 minutos, lavar, agregar lugol por 1 minuto, eliminar el lugol y volver a lavar, luego decolorar por 20 segundos con una solución de alcohol- acetona, lavar y teñir con safranina por 10 segundos. Finalmente lavar, secar la preparación y observar al microscopio.

b) Tinción de Wirtz: permite poner en evidencia las endosporas bacterianas, estructuras de resistencia que presentan algunas bacterias aerobias y anaerobias.

Técnica: en un portaobjeto extender una pequeña cantidad del microorganismo en estudio y fijar pasando 20 veces por la llama del mechero, luego teñir con el colorante verde de malaquita al 7.6% por 8 minutos, lavar y teñir con safranina al 0.25% por 15 segundos. Finalmente lavar, secar y observar al microscopio.

### **3.2.5 Determinación de parámetros físicos y químicos en muestras de agua y sedimento.**

A cada una de las muestras de agua y sedimento se le determinó la temperatura, pH y salinidad como se señala a continuación.

#### **3.2.5.1 Temperatura**

Las muestras de agua saladas fueron colectadas a 40 metros de distancia desde el muelle de Niebla, la temperatura, fue medida en forma manual con un termómetro introducido a 50 cm de profundidad en el agua. Para las muestras de agua dulce, la temperatura se determinó manteniendo el termómetro en forma fija sobre la caída de agua del Estero. Tanto para las muestras de sedimento salado como dulce, la temperatura fue registrada introduciendo el termómetro en el sedimento inmediatamente después de ser recolectados.

#### **3.2.5.2 pH**

Una vez que las muestras (agua y sedimento) fueron trasladadas al Instituto de Microbiología, se procedió a la medición del pH, el que fue determinado con papel indicador de pH. Para las muestras de agua dulce y salada el papel indicador fue introducido al interior de las botellas que contenía el agua, hasta que el extremo del papel cambie de color, el que fue comparado con un estandar que represente el color obtenido según el pH. Para las muestras de sedimento dulce y salado, la medición del pH se llevo a cabo, diluyendo 10 grs de sedimento en 100 mL de agua destilada, el que fue agitado para mezclar el contenido. La determinación del pH se realizó de igual manera que las muestras de agua.

### **3.2.5.3 Salinidad**

La medición de la salinidad para las muestras de agua y sedimento salados fueron registradas por un salinómetro. Este aparato luego de ser calibrado con agua destilada, se procede a poner una gota de la muestra de agua, donde se podrá registrar la salinidad que presenta. Para el sedimento se realiza el mismo protocolo.

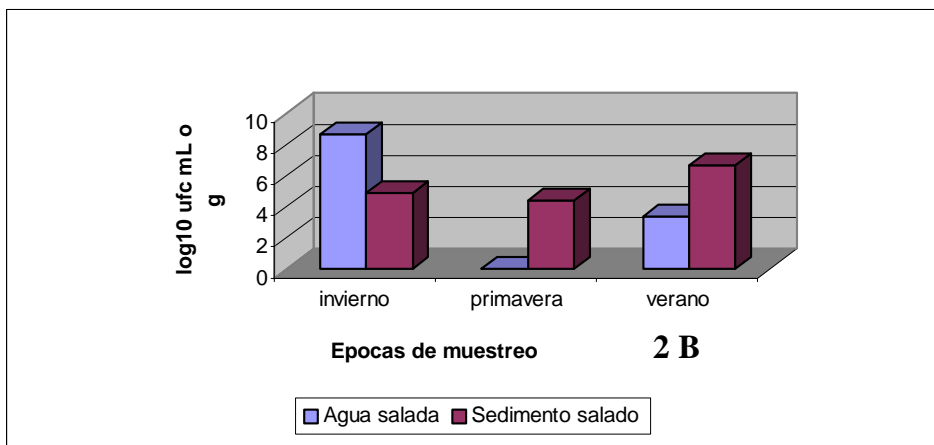
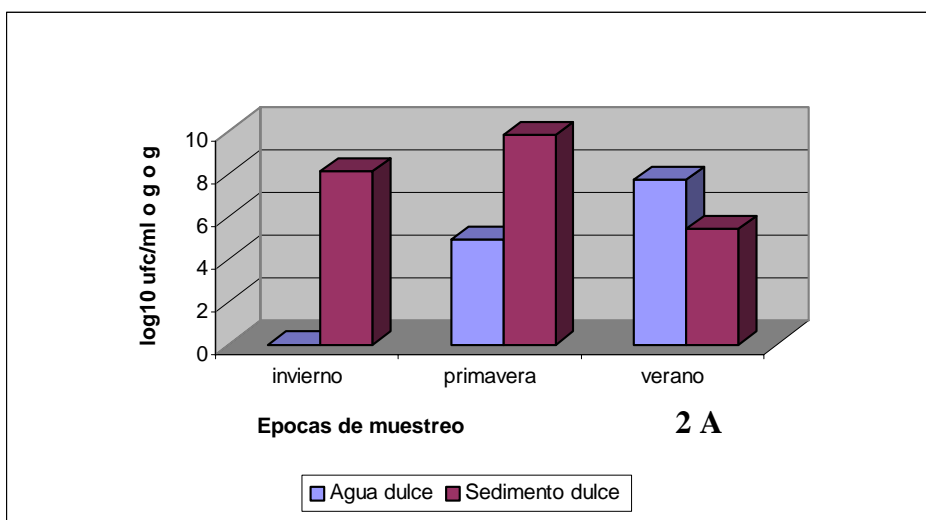
### **3.2.6 Parámetros climáticos del lugar de estudio.**

Los valores de temperatura y luminosidad (PAR y UVB) del lugar de estudio para cada periodo de muestreos fueron facilitados respectivamente por el Instituto de Geociencias e Instituto de Física de la Universidad Austral de Chile.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas psicrófilas viables desde muestras de agua y sedimentos dulce y salado.

En la Figura 2, se indican las poblaciones bacterianas heterótrofas psicrófilas viables determinadas en muestras de agua y sedimento dulce y salado de acuerdo a la época de muestreo.



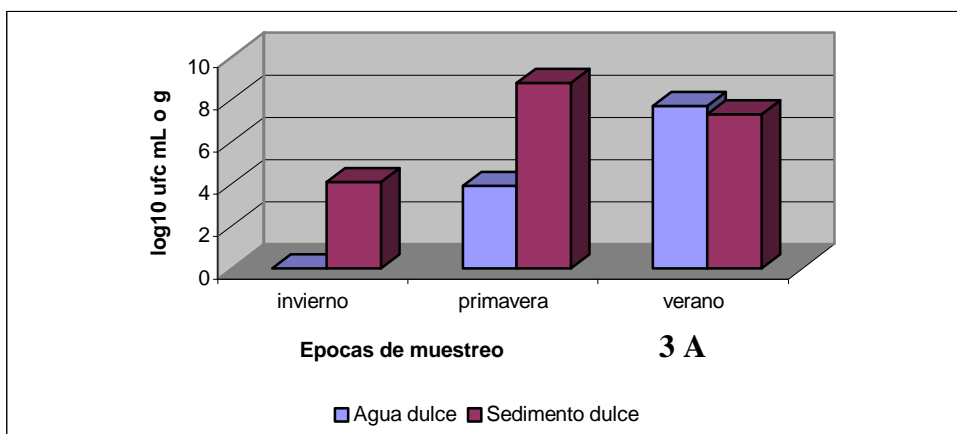
**FIGURA 2:** Población bacteriana heterótrofa psicrófila viable (2A): de agua y sedimento dulce y (2B): de agua y sedimento salado determinados en las épocas de muestreo.

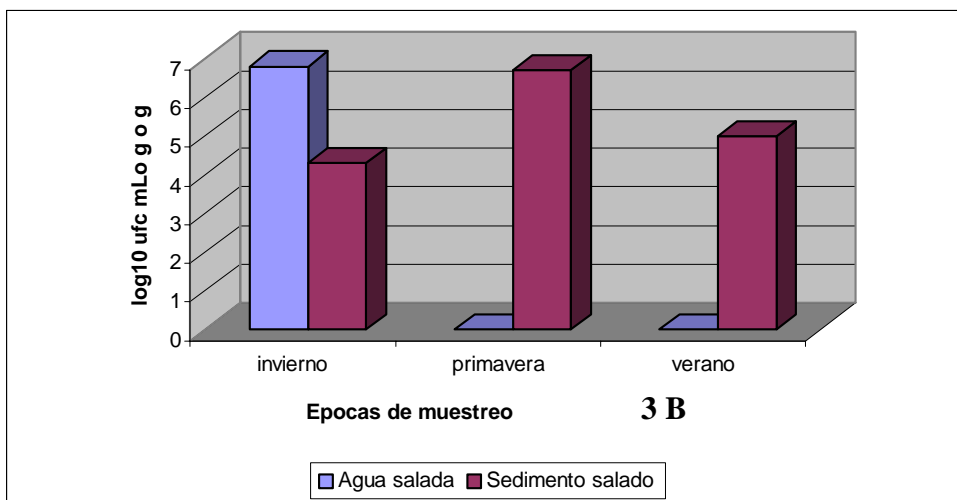
Como se observa en la Figura 2A, en las muestras de agua dulce la mayor población bacteriana ( $55.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 7.7$ ) se determinó durante la época de verano y la menor población, se registro en invierno, pues no se registraron poblaciones bacterianas. Por su parte desde las muestras de sedimento dulce la mayor población ( $7.000.000 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10} 9.8$ ) se determinó en primavera y la menor ( $310 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10} 5.4$ ) en verano.

Como se observa en la Figura 2B, en las muestras de agua salada la mayor población bacteriana ( $600.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 8.7$ ) se determinó durante la época de invierno y la menor población en primavera (sin registro de poblaciones bacterianas), por otra parte desde las muestras de sedimento salado la mayor población ( $6.100 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10} 6.7$ ) se determinó en verano y la menor ( $30 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10} 4.4$ ) en primavera.

#### 4.2 Recuento de poblaciones bacterianas pigmentadas desde muestras de agua y sedimentos dulce y salado.

En la Figura 3, se indican las poblaciones bacterianas pigmentadas determinadas en las muestras de agua y sedimento dulce y salado de acuerdo a la época de muestreo.





**FIGURA 3:** Poblaciones bacterianas pigmentadas de agua y sedimento dulce (3A) y (3B) de agua y sedimento salado determinados en las épocas de muestreo.

Como se observa en la Figura 3A, en las muestras de agua dulce la mayor población bacteriana ( $55.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 7.7$ ) se determinó durante la época de verano y la menor población en invierno (no se registraron poblaciones de bacterias pigmentadas), por su parte desde las muestras de sedimento dulce la mayor población ( $700.000 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10} 8.8$ ) se determinó en primavera y la menor ( $15 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10} 4.1$ ) en invierno.

Como se observa en la Figura 3B, en las muestras de agua salada la mayor población bacteriana ( $7.200 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 6.8$ ) se determinó durante la época de invierno, durante la época de primavera y verano no se registraron bacterias pigmentadas. Desde las muestras de sedimento salado la mayor población ( $5.100 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10} 6.7$ ) se determinó en primavera y la menor ( $20 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log 4.3$ ) en invierno.

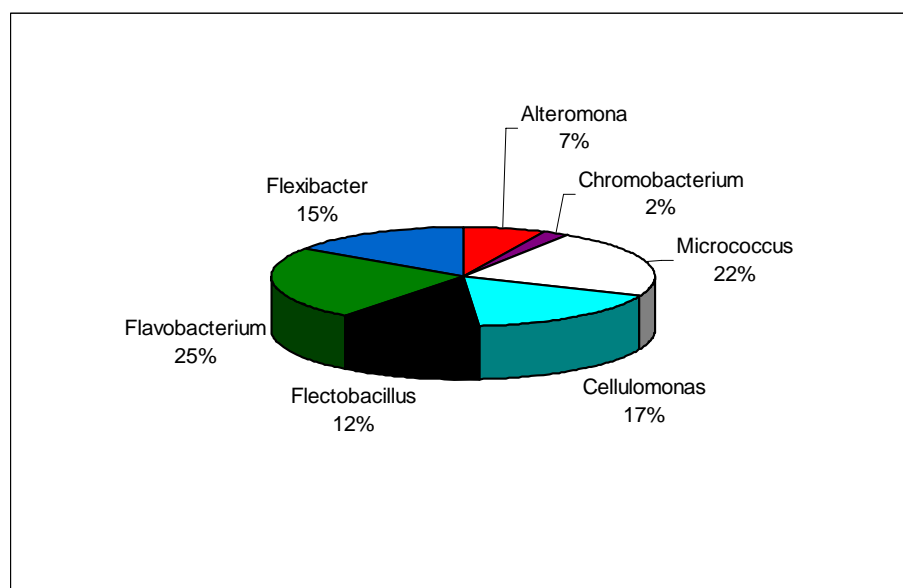


### 4.3 Taxonomía de bacterias pigmentadas de agua y sedimentos dulce y salado.

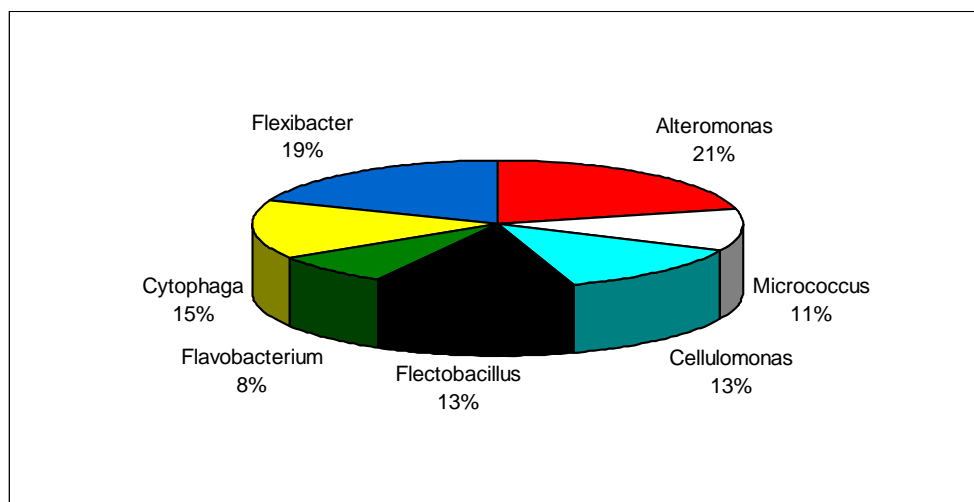
Del total de cepas (540), que fueron aisladas desde las muestras de agua y de sedimento dulce y salados durante los tres muestreos realizados, se determinaron un total de 8 géneros, a saber: *Alteromonas*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus*, *Flexibacter*, *Micrococcus*. Además se determinó un predominio de las bacterias Gram negativas, constituyendo el 56.1% y el porcentaje restante (43,8%) estuvo representado por bacterias Gram positivas.

#### 4.3.1 Taxonomía de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de agua dulce y salada.

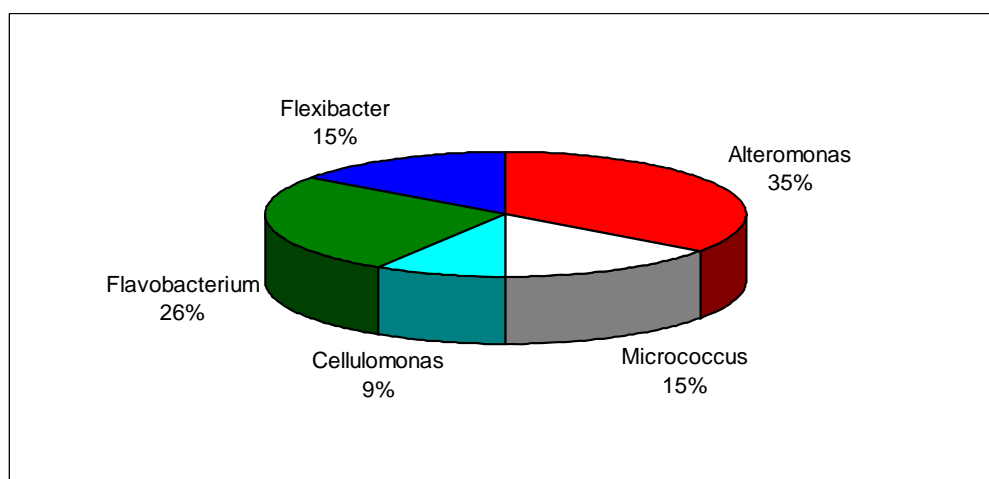
En la Figura 4 a la 6, se muestra la distribución porcentual de las taxa de bacterias pigmentadas para las muestras de agua dulce y salada en cada época de muestreo.



**FIGURA 4:** Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de agua salada, muestreo de invierno.



**FIGURA 5:** Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de agua dulce, muestreo de primavera.



**FIGURA 6:** Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de agua dulce, muestreo de verano.

En las muestras de agua salada solo se registraron bacterias pigmentadas en el muestreo de invierno (Fig. 4), y correspondieron a las siguientes taxa *Alteromonas*,

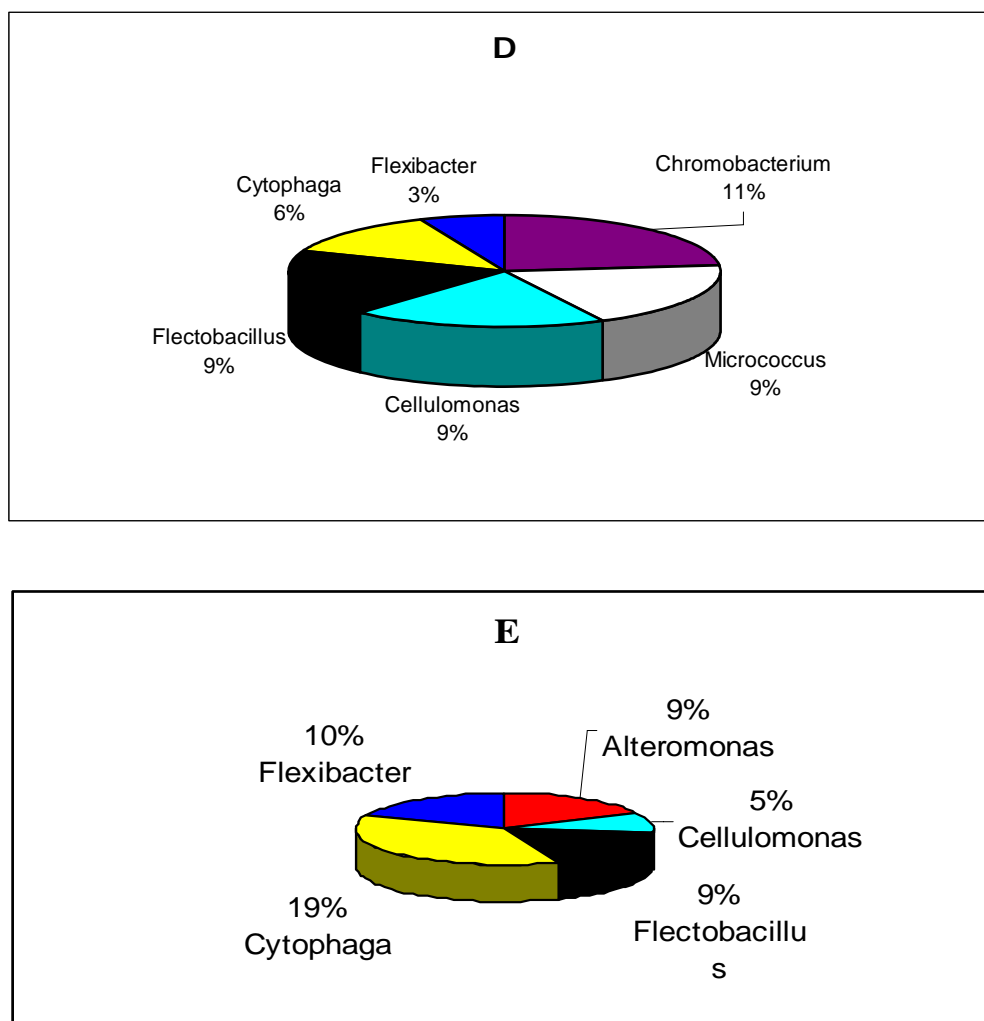
*Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus*, *Flexibacte* y *Micrococcus*. El mayor porcentaje poblacional correspondió al género *Flavobacterium* (25%), y el menor porcentaje poblacional (2%) correspondió al género *Chromobacterium*.

En las muestras de agua dulce independiente de la época de muestreo se registraron las siguientes taxa *Alteromonas*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus*, *Flexibacter* y *Micrococcus*. Por otra parte, el mayor porcentaje poblacional (35%) se determinó en el muestreo de verano (Fig. 6) y correspondió al género *Alteromona*, y el menor porcentaje correspondió al género *Flavobacterium* (8%) del muestreo de primavera ( Fig. 5). Hay que señalar que en la época de invierno no se aislaron bacterias pigmentadas desde muestras de agua dulce.

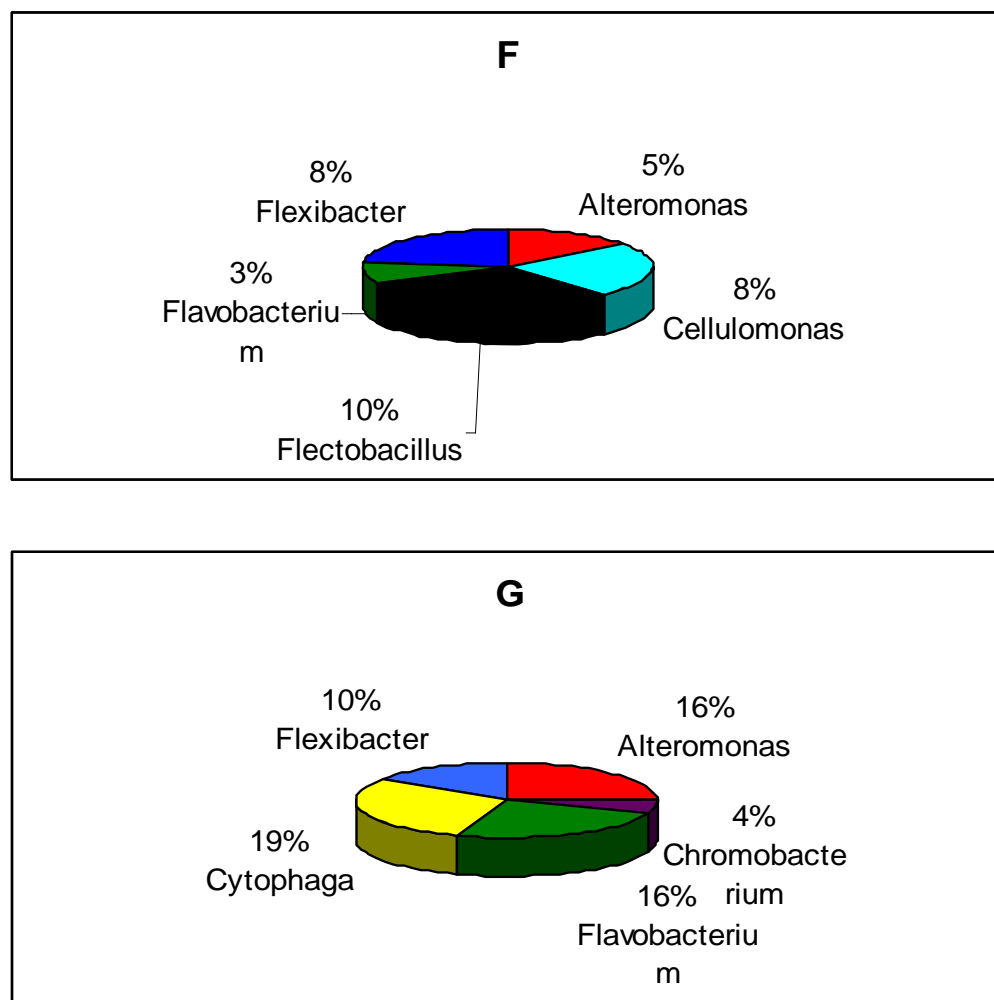
En cuanto a la diversidad de taxa, la mayor (7 taxa) se determinó en la muestra de agua dulce en la época de primavera (Fig. 5), y las taxa correspondieron a: *Cytophaga*, *Alteromonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Flectobacillus*, *Flavobacterium* y *Flexibacter*. En invierno en la muestra de agua salada ( Fig. 4) tambien hubo 7 taxa y correspondieron a: *Alteromonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Flectobacillus*, *Flavobacterium* y *Fexibacter*. Por su parte, la menor diversidad (5 taxa) se determinó en la época de verano (Fig. 6), y correspondieron a *Alteromonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium* y *Flexibacter*. Es importante hacer notar que *Chromobacterium* solo fue aislada durante la época de invierno ( Fig. 4) y *Cytophaga* solo en primavera (Fig. 5).

### 4.3.2 Taxonomía de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de sedimento dulce y salado.

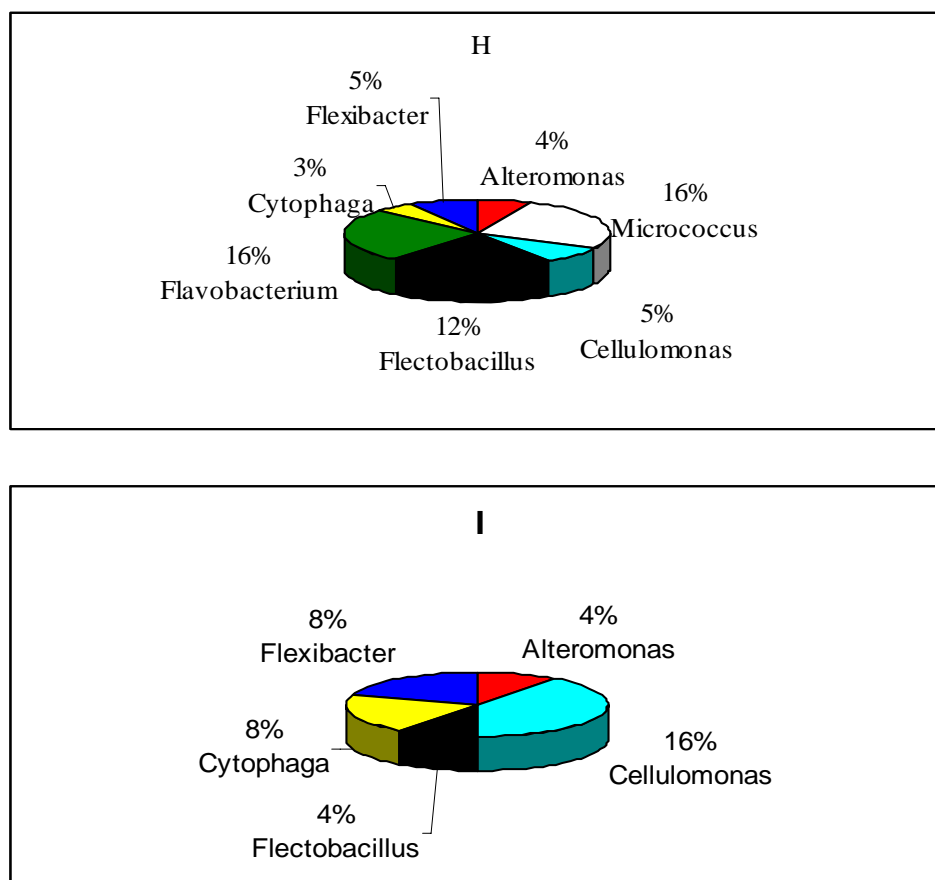
En la Figura 7 a la 9, se muestra la distribución porcentual de las taxas de bacterias pigmentadas para las muestras de sedimento dulce y salado en cada época de muestreo.



**FIGURA 7:** Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de sedimento. (D) dulce; (E) salado, para el muestreo de invierno.



**FIGURA 8:** Distribución porcentual de bacterias pigmentadas de sedimento. (F) dulce; (G) salado, para el muestreo de primavera.



**FIGURA 9:** Distribución porcentual de bacterias pigmentadas en muestras de sedimento. (H) dulce; (I) salado, para el muestreo de verano.

En las muestras de sedimento dulce (Fig. 7D, 8F, 9H) taxonómicamente se registraron los siguientes géneros bacterianos: *Alteromonas*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus*, *Flexibacter* y *Micrococcus*. El mayor porcentaje poblacional (16%) se registró en el muestreo de verano (Fig. H) y correspondió a los géneros *Flavobacterium* y

*Micrococcus*, y el menor porcentaje poblacional correspondió a los géneros *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Flexibacter* (3%) en los muestreos de verano (Figura 9H), primavera (Fig. 8F) e invierno (Fig. 7D) respectivamente.

En las muestras de sedimento salado (Fig. 7E, 8G, 9I) taxonómicamente se registraron las siguientes taxas: *Alteromonas*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus* y *Flexibacter*. El mayor porcentaje poblacional (19%) se determinó en los muestreos de invierno y primavera (Fig. 7E y 8G) y correspondió al género *Cytophaga*, y el menor porcentaje poblacional de bacterias pigmentadas correspondió a los géneros *Alteromonas*, *Chromobacterium* y *Flectobacillus* (4%) registrados en los muestreos de primavera y verano respectivamente (Fig. 8G y 9I).

En cuanto a la diversidad de taxa de acuerdo a la época de muestreo y tipo de sedimento (dulce o salado), se determinó que la mayor diversidad de taxa (7 taxa) *Alteromonas*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus*, *Flexibacter* y *Micrococcus* se registró en el sedimento dulce de verano. Por su parte, en las muestras de sedimento salado se registró igual diversidad de taxa (5 taxa) en todas las épocas de muestreo.

### 4.3.3 Características de las taxa determinadas

- a) *Alteromonas*: (Fig.10d) Bacilos de 0.7 – 1.5 x 1.8 – 30  $\mu\text{m}$ . No forman esporas. Gram negativas. Movilidad ocurre por medio de un solo flagelo. Quimiorganótrofo. Metabolismo tipo respiratorio pero no fermentativo, oxígeno como aceptor terminal de electrones. Pueden presentar colonias de diversos colores amarillas, rojas, naranjas y

violetas. Crecen a 20 °C. Oxidasa positiva, catalasa débilmente positiva, todas requieren de medio marino para su crecimiento. Se pueden encontrar en zonas costeras y océanos. (Holt *et al.* , 1994).

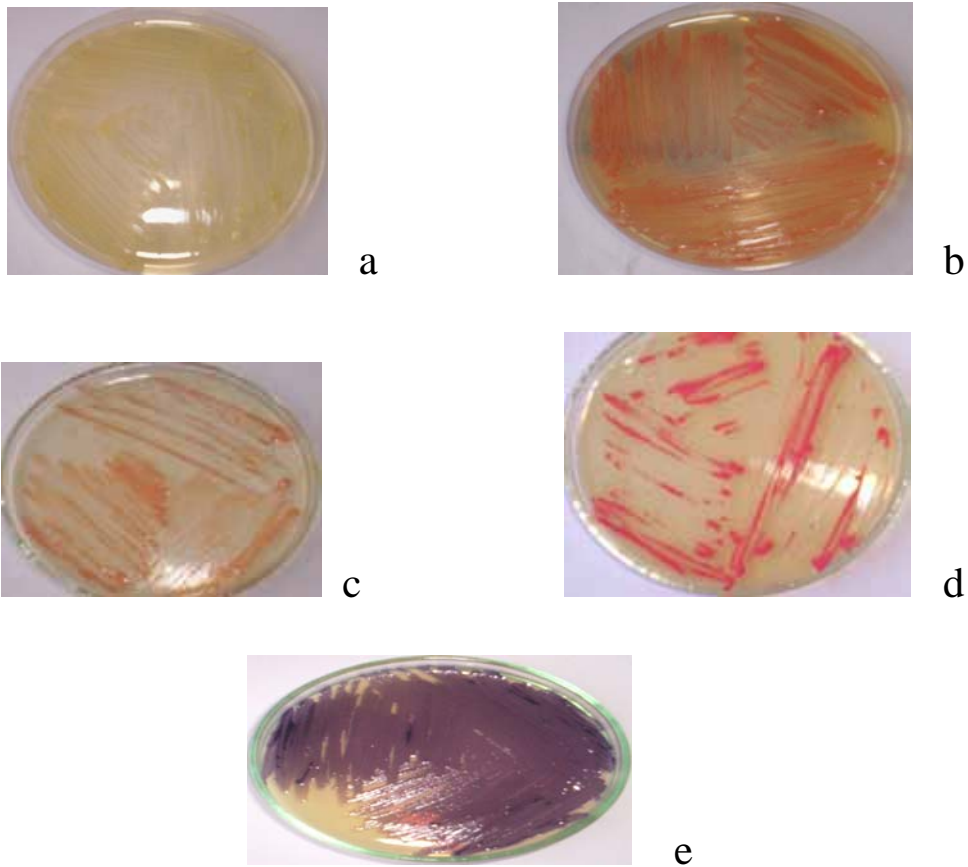
- b) *Cellulomonas*: Bacilos delgados de 0.5-0.6 x 2.0-5.0 um, se pueden presentar en pares y ocasionalmente formando racimos. Gram positivos. Presentan motilidad por uno o pocos flagelos. Anaerobios facultativos, quimiorganótrofas con metabolismo respiratorio y fermentativo. Usualmente la coloración de las colonias es amarillo. Catalasa positiva, reduce nitrato. Su temperatura óptima de crecimiento es 30 °C. Distribuidas ampliamente en suelos y materia vegetal. (Holt *et al.* , 1994).
- c) *Chromobacterium*: (Fig.10e) Bacilos de 0.6 – 0.9 x 1.5 – 3.5 um. Se encuentran solos y ocasionalmente en pares o formando cadenas largas o cortas. Gram negativos. Generalmente móviles por un flagelo polar, anaerobios facultativos. En medio sólido presentan colonias butirosas de color violeta, temperatura óptima de crecimiento 25 °C. Quimiorganoheterótrofos, principalmente con metabolismo fermentativo. Usualmente oxidasa positiva aunque el pigmento violeta puede inferir en la lectura. Catalasa positiva, indol y Voges – Prokauer negativos, nitrato es reducido, licua gelatina. Se encuentra en suelos y agua, *C. violaceum* ocasionalmente causa serias infecciones patogénicas en animales o humanos. (Holt *et al.* ,1994).
- d) *Cytophaga*: (Fig.10c) Bacilos cortos o moderadamente largos de 0.3-0.8 x 1.5-15 um. Gram negativos. Estrictamente anaerobias facultativas, metabolismo respiratorio o



fermentativo. Colonias intensamente pigmentadas de color amarillas, naranjas o rojas. Catalasa positiva, oxidasa negativa, indol y gelatina usualmente positivas, no reduce nitrato. Su temperatura optima es 20-35°C. Descomponen materia orgánica encontrándose comúnmente en agua fresca y habitat marinos. ( Holt *et al.* , 1994).

- e) *Flavobacterium*: (Fig.10b) Bacilos, de 1.0-3.0 x 0.5 um. Gram negativos. Inmoviles, aerobios, metabolismo respiratorio, su temperatura óptima de crecimiento es de 5- 30°C. Colonias típicamente pigmentadas amarillas a anaranjadas. Catalasa y oxidasa positivas, quimiorganonótrofas. Ampliamente distribuidas en suelos y agua. (Silva, 2002).
  
- f) *Flectobacillus*: Bacilos largos, delgados y curvados de 0.3-2.0 x 1-31 um. Gram negativos. Inmoviles. La temperatura óptima para su crecimiento es 20-30°C, *F.glomeratus* requiere temperaturas solo hasta 25°C. Las colonias son rosado pálido, rojas amarillas, dependiendo de la especie. Aerobias, metabolismo respiratorio, oxígeno como aceptor terminal de electrones. Quimiorganótrofa. Oxidasa y catalasa positiva. Gelatina licuada débilmente. Distribuidas en aguas marinas. ( Holt *et al.* , 1994).
  
- g) *Flexibacter*: Bacilos de longitud variable de 10-50 x 0.2-0.6 um, flexibles. Gram negativos, inmóviles, quimiorganótrofos, aeróbios obligados o anaerobios facultativos catalasa y oxidasa positivas. Las colonias suelen ser de color amarillo y naranjas, pero estos pueden variar a tonos como el rojo o café cuando están cubiertos de una solución alcalina. Aislados principalmente de aguas dulces y marinas. ( Holt *et al.* , 1994).

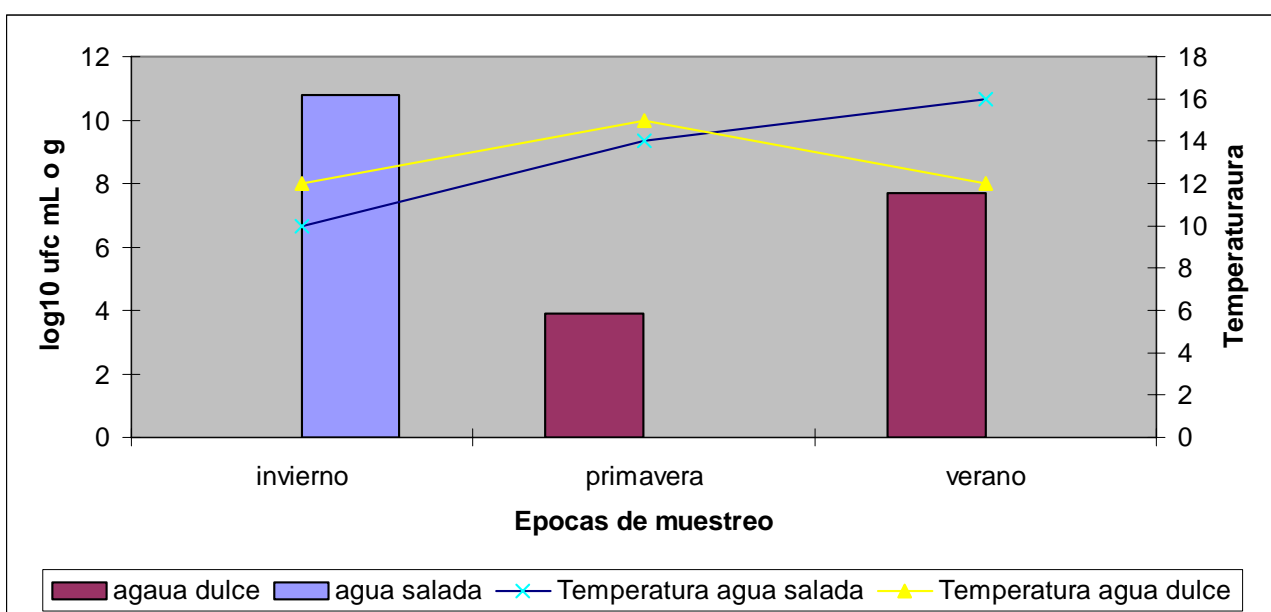
h) *Micrococcus*: (Fig.10a) Cocos de 0.5- 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentran agrupados en pares, tétradas o racimos irregulares. Gran positivos. Raramente móviles, no esporulados, estrictamente aeróbios, quimiorganótrofos con metabolismo respiratorio. Catalasa y oxidasa positivas. Usualmente halotolerantes, creciendo con 5 % de NaCl. Su temperatura óptima de crecimiento es 25- 37 °C. Las colonias generalmente pigmentadas de color amarillas ( *M. luteus*) o rojo ( *M. kristinae*). Principalmente aislados desde medios comunes. ( Holt *et al.* , 1994).



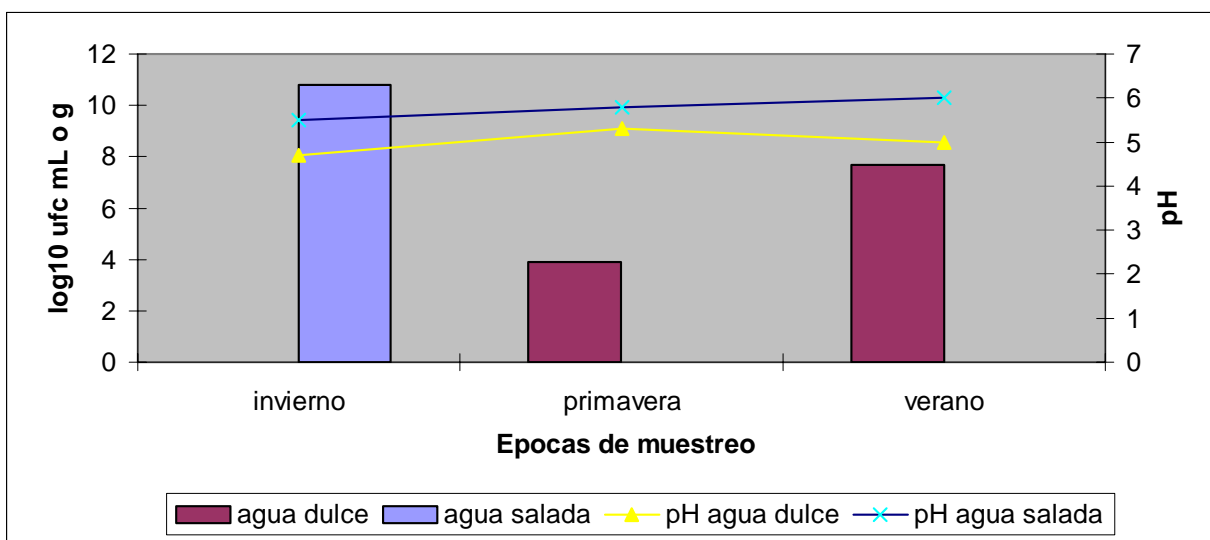
**FIGURA 10:** Morfología de bacterias pigmentadas aisladas desde agua y sedimento dulce y salado. F10a: *Micrococcus*, F10b: *Flavobacterium*, F10c: *Cytophaga*, F10d: *Alteromonas*, F10e: *Chromobacterium*.

#### 4.4 Poblaciones bacterianas pigmentadas de muestras de agua dulce y salada de acuerdo a su relación con parámetros físicos y químicos.

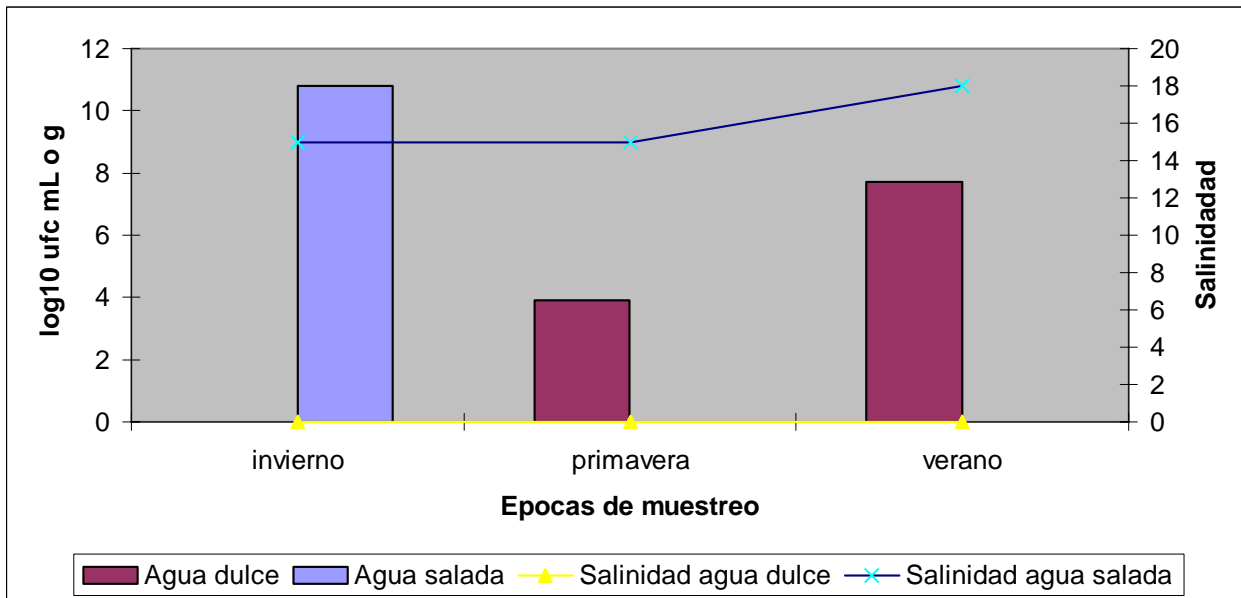
En la Figura 11, se muestran las variaciones de las poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y saladas, para cada época de muestreo, de acuerdo a la temperatura (Fig.11A), pH (Fig.11B), salinidad (Fig. 11C) y luminosidad (Fig. 11D).



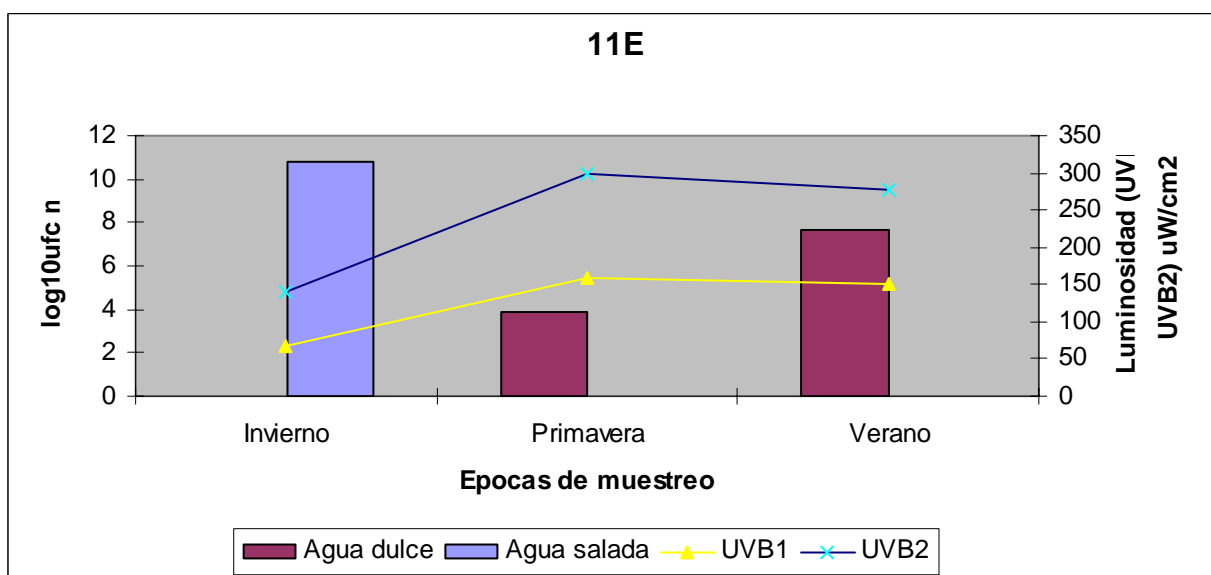
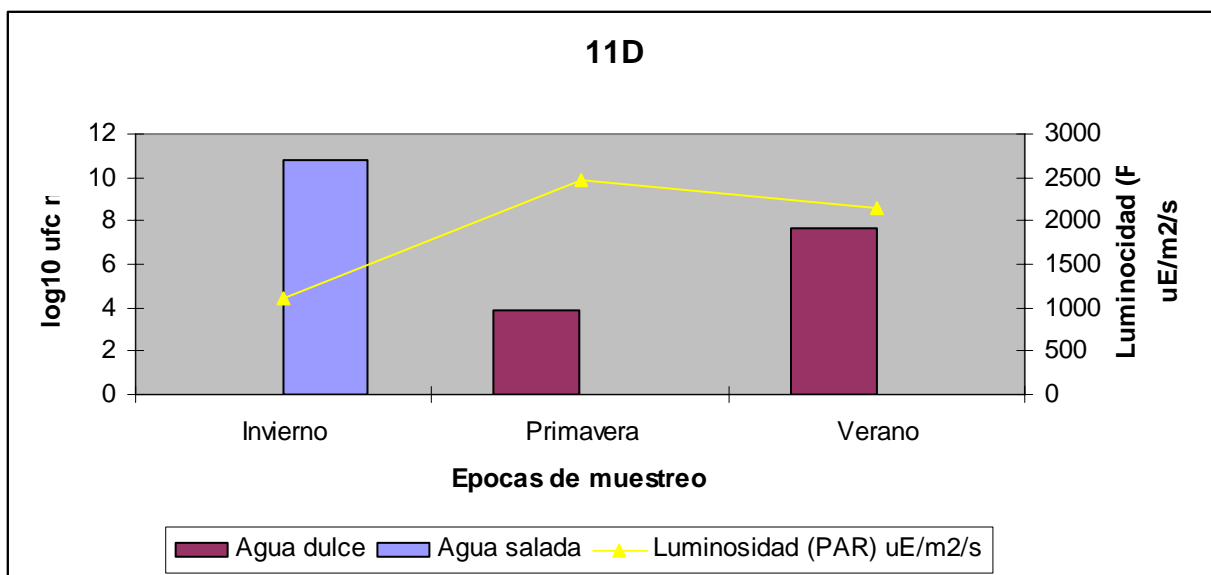
**FIGURA 11 A:** Variación de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo a la temperatura.



**FIGURA 11 B:** Variación de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo al pH.



**FIGURA 11 C:** Variación de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo a la salinidad.



**FIGURA 11:** Variación de poblaciones bacterianas pigmentadas de agua dulce y salada de acuerdo a: D = la luminosidad (PAR) y E = la luminosidad (UVB1 y UVB2).

#### 4.4.1 Temperatura.

En la Figura 11 A, se muestra la variación de temperatura del agua del lugar de muestreo registrada durante las épocas de muestreo versus las poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa la mayor temperatura del agua dulce (15 °C) se registró en primavera y se relacionó con la menor población de bacterias pigmentadas ( $8 \times 10^3$  ufc mL<sup>-1</sup> = log<sub>10</sub> 3.9) por su parte la menor temperatura del agua dulce (12°C) se registró en verano y se relacionó con la mayor población bacteriana pigmentada ( $55.000 \times 10^3$  ufc mL<sup>-1</sup> = log<sub>10</sub> 7.7), en invierno se presentó la misma temperatura que en verano pero no se registraron poblaciones bacterianas pigmentadas. Por otra parte la mayor temperatura del agua salada (16 °C), se registró en verano, época en la cual no se determinó bacterias pigmentadas y la menor temperatura del agua salada (10 °C) se determinó en la época de invierno y se correlacionó con la mayor población ( $17.000.000 \times 10^3$  ufc mL<sup>-1</sup> = log<sub>10</sub> 10.8) de bacterias pigmentadas del agua salada.

#### 4.4.2 pH.

En la Figura 11 B, se muestra la variación del pH del agua del lugar de muestreo registrada durante las épocas de muestreo versus las poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa el mayor pH de agua dulce (5.3) se registró en primavera y se relacionó con la menor población de bacterias pigmentadas ( $8 \times 10^3$  ufc mL<sup>-1</sup> = log<sub>10</sub> 3.9) por su parte el menor pH del agua dulce (4.7) se determinó en invierno, y no se registraron bacterias pigmentadas. Por su parte el mayor pH de agua salada (6.0) se registró en verano, época en la cual no se determinaron bacterias pigmentadas y el menor pH de agua salada (5.5) se determinó en la época de invierno y se correlacionó con la mayor población ( $17.000.000 \times 10^3$  ufc mL<sup>-1</sup> = log<sub>10</sub> 10.8) de bacterias pigmentadas de agua salada.

#### 4.4.3 Salinidad.

En la Figura 11 C, se muestra la variación de la salinidad del agua del lugar de muestreo registrada durante las épocas de muestreo versus la poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa la salinidad del agua dulce (0 S‰) y se registró en todas las épocas de muestreo y no se relacionó con la mayor o menor población de bacterias pigmentadas. Por su parte la mayor salinidad del agua salada (18 S‰) se registró en verano, época en la cual no se determinaron bacterias pigmentadas y la menor salinidad del agua salada (15 S‰) se determinó en invierno y se correlacionó con la mayor población ( $17.000.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 10.8$ ), en primavera igual se presentó la misma salinidad (15 S‰) en la cual no se determinaron bacterias pigmentadas del agua salada.

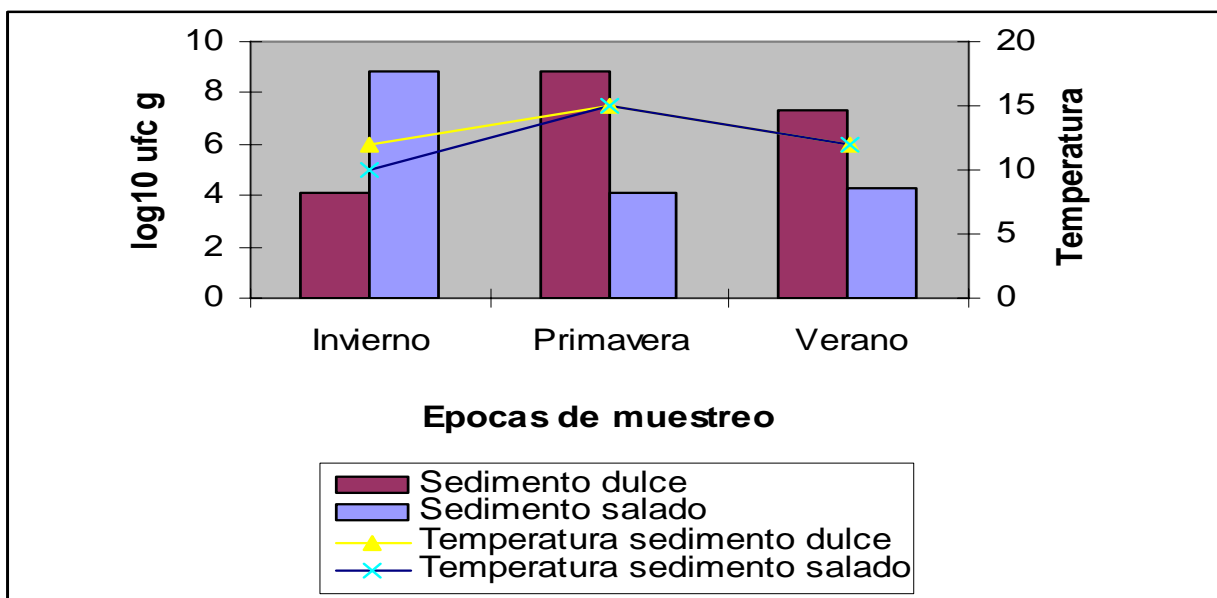
#### 4.4.4 Luminosidad.

En la Figura 11 D, se muestra la variación de la luminosidad PAR, en la Figura 11E se muestra la variación de la radiación UVB1 y UVB2 del sitio de muestreo con respecto a las muestras de agua registradas durante las épocas muestreo versus las poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa en la Fig.11D la mayor radiación PAR ( $2464.7 \text{ uE/m}^2/\text{s}$ ) se registró en la época de primavera junto con la época de verano ( $2144.1 \text{ uE/m}^2/\text{s}$ ), se relaciona con la mayor población de bacterias pigmentadas aisladas desde la muestra de agua dulce ( $55.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 7.7$ ) del muestreo de verano. Por su parte el menor índice de radiación PAR ( $1115.6 \text{ uE/m}^2/\text{s}$ ) se registró en la época de invierno, relacionándose con la mayor población de bacterias pigmentadas ( $17.000.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 10.8$ ) desde agua salada. En la Fig.11E el mayor índice de UVB1 y UVB2 se registró en verano ( $276 \text{ uW/cm}^2$ ), relacionándose con las mayor población de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de agua dulce ( $55.000 \times 10^3 \text{ ufc mL}^{-1} = \log_{10} 7.7$ ),

por su parte el menor índice de UVB1 y UVB2 (66.3 y 140.4  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) se registró en la época de invierno, donde se registró la menor población bacteriana pigmentada desde muestras de agua dulce salada.

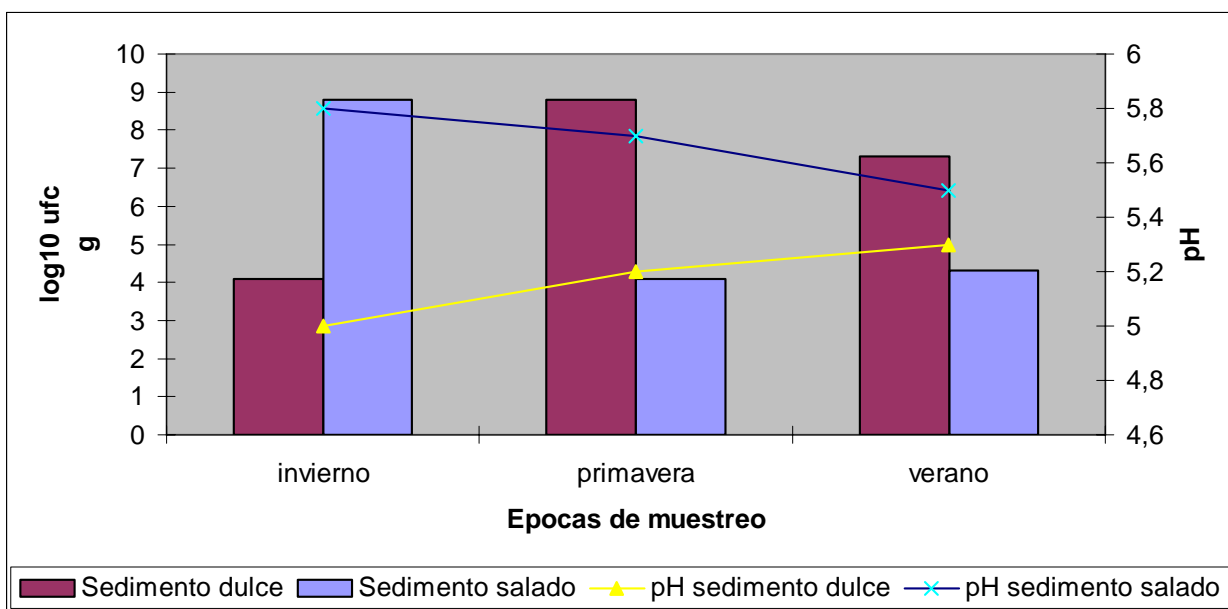
#### 4.5 Poblaciones bacterianas pigmentadas de muestras de sedimento dulce y salado de acuerdo a su relación con parámetros físicos y químicos.

En la Figura 12, se muestran las variaciones de las poblaciones pigmentadas en muestras de sedimentos dulce y salados, para cada época de muestreo, de acuerdo a la temperatura (Fig.12A), pH (Fig.12B), salinidad (Fig.12C) y luminosidad (Fig.12D).

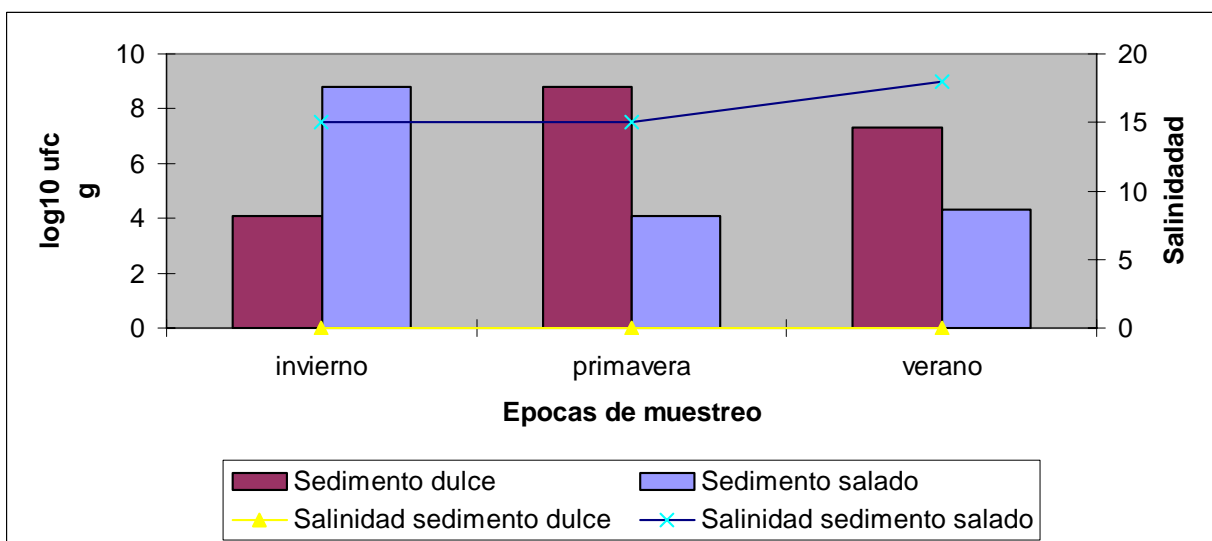


**FIGURA 12 A:** Variación de poblaciones bacterianas de sedimento dulce y salado de acuerdo a la temperatura.

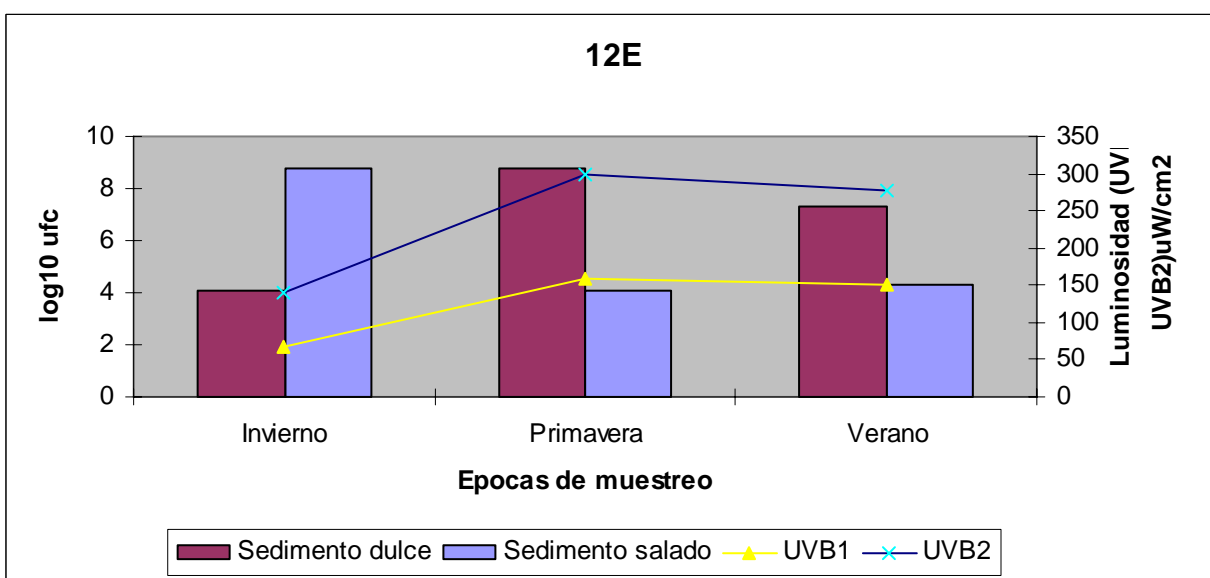
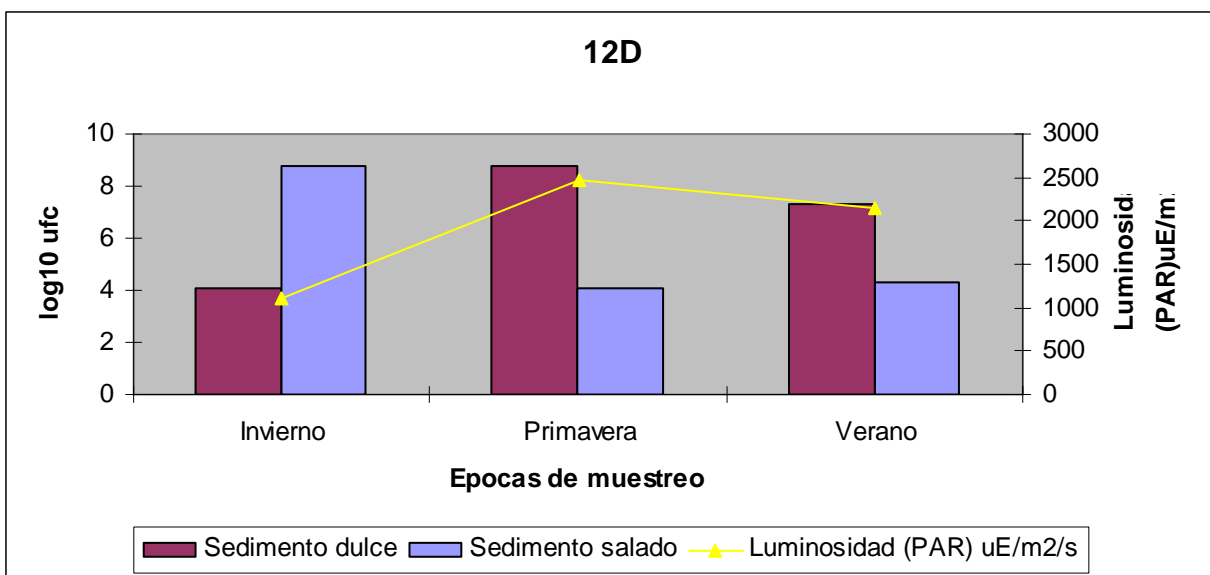




**FIGURA 12 B:** Variación de poblaciones bacterianas de sedimento dulce y salado de acuerdo al pH.



**FIGURA 12C:** Variación de poblaciones bacterianas de sedimento dulce y salado de acuerdo a la salinidad.



**FIGURA 12:** Variación de poblaciones bacterianas pigmentadas de sedimento dulce y salado de acuerdo a: D = la luminosidad (PAR) y E = luminosidad (UVB1 y UVB2).

#### 4.5.1 Temperatura.

En la Figura 12 A, se muestra la variación de la temperatura de sedimento del lugar de muestreo registrada durante las épocas de muestreo versus las poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa la mayor temperatura del sedimento dulce (15 °C) se registró en primavera y se relacionó con la mayor población de bacterias pigmentadas ( $700.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. =  $\log_{10}8.8$ ) por su parte la menor temperatura de sedimento dulce (12 °C) se determinó en verano y también en invierno donde se registró la menor población de bacterias pigmentadas ( $15 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. =  $\log_{10}4.1$ ). Por su parte la mayor temperatura del sedimento salado (15 °C) se registró en primavera y se relacionó con la menor población de bacterias pigmentadas ( $15 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. =  $\log_{10}4.1$ ) y la menor temperatura de sedimento salado (10 °C) se determinó en invierno y se correlacionó con la mayor población ( $50.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed.=  $\log_{10}8.8$ ) de bacterias pigmentadas de sedimento salado.

#### 4.5.2 pH.

En la Figura 12 B, se muestra la variación del pH de sedimento del lugar de muestreo registrada durante las épocas de muestreo versus las poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa el mayor pH del sedimento dulce (5.3) se registró en verano presentando una población de bacterias de  $21.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. =  $\log_{10}7.3$  y el menor pH de sedimento dulce (5.0) se determinó en invierno y se relacionó con la menor población bacteriana pigmentada ( $15 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. =  $\log_{10}4.1$ ). Por su parte, el mayor pH de sedimento salado (5.8) se registró en invierno y se correlacionó con la mayor población ( $50.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed.=  $\log_{10}8.8$ ) de bacterias pigmentadas de sedimento salado y el menor pH de sedimento salado (5.5) se determinó en verano registrándose  $20 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. =  $\log_{10}4.3$  poblaciones de bacterias pigmentadas.

### 4.5.3 Salinidad.

En la figura 12 C, se muestra la variación de la salinidad de sedimento del lugar de muestreo registrada durante las épocas de muestreo versus las poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa la salinidad del sedimento dulce (0 S‰) y se registró en todas las épocas de muestreo y no se relacionó con la mayor o menor población bacteriana pigmentada del sedimento dulce. Por su parte la mayor salinidad de sedimento salado (18 S‰) se registró en verano época en la cual se registraron  $20 \times 10^3$  ufc g<sup>-1</sup> sed. = log<sub>10</sub>4.3 bacterias pigmentadas y la menor salinidad (15 S‰) se determinó en invierno y se correlacionó con la mayor población ( $50.000 \times 10^3$  ufc g<sup>-1</sup> sed. = log<sub>10</sub>8.8) de bacterias pigmentadas, en primavera también se presentó la misma salinidad (15 S‰) y se relacionó con la menor población bacteriana pigmentada ( $15 \times 10^3$  ufc g<sup>-1</sup> sed. = log<sub>10</sub>4.1).

### 4.5.4 Luminosidad.

En la Figura 12 D, se muestra la variación de la luminosidad PAR, en la Figura 12E se muestra la variación de la radiación UVB1 y UVB2 del sitio de muestreo con respecto a las muestras de sedimento registrados durante las épocas muestreo versus las poblaciones bacterianas pigmentadas. Como se observa en la Fig.12D la mayor radiación PAR (2464.7 uE/m<sup>2</sup>/s) se registró en la época de primavera donde se determinó la mayor población de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de sedimento dulce ( $700.000 \times 10^3$  ufc g<sup>-1</sup> sed. = log<sub>10</sub>8.8), en tanto el menor índice de radiación PAR (1115.6 uE/m<sup>2</sup>/s) se registró en la época de invierno, relacionándose con el mayor registro de poblaciones bacterianas pigmentadas desde muestras de sedimento salado ( $50.000 \times 10^3$  ufc g<sup>-1</sup> sed. = log<sub>10</sub>8.8). En la Fig. 12E el mayor índice de UVB1

y UVB2 se registró en la de verano ( $276 \text{ uW/cm}^2$ ), relacionándose con la mayor población de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de sedimento dulce ( $21.000 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10}7.3$ ), por su parte el menor índice de UVB1 y UVB2 ( $66.3$  y  $140.4 \text{ uW/cm}^2$ ) se registró en la época de invierno, donde se registró la menor población de bacterias pigmentadas ( $15 \times 10^3 \text{ ufc g}^{-1} \text{ sed.} = \log_{10}4.1$ ).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas psicrófilas viables desde muestras de agua y sedimento dulce y salado.

En el presente estudio, en el muestreo de invierno se cuantificó un total de  $49 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. desde muestras de sedimento dulce, y no se cuantificaron poblaciones bacterianas desde muestras de agua dulce, mientras que, en el muestreo de primavera se determinaron  $7.000.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. y  $90 \times 10^3$  ufc  $mL^{-1}$  desde muestras de sedimento y agua dulce respectivamente y en el muestreo de verano se determinaron  $310 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. y  $55.000 \times 10^3$  ufc  $mL^{-1}$ , desde muestras de sedimento y agua dulce respectivamente. Esta distribución de poblaciones bacterianas es mayor en las muestras de sedimentos dulce del muestreo de invierno y muestreo de primavera en comparación con las determinadas en agua, estos resultados concuerdan con los señalados por Davies *et al.* (1995), quienes indican que en cuerpos de agua dulce la abundancia de bacterias es mayor en los sedimentos, debido a que el sedimento otorga a las bacterias un microhábitat rico en nutrientes, completamente opuesto a lo que se encuentra en la columna de agua. De acuerdo a lo establecido por Herbert (1999) citado por Garay (2003), la gran cantidad de bacterias que se encuentran en los sedimentos se debería a que éstas aprovechan la materia orgánica suspendida, por lo que se forman microzonas donde ocurre la acumulación y transformación del humus acuático. Por el contrario, en el muestreo de verano se determinó una menor población de bacterias en las muestras de sedimento dulce, versus de muestras de agua dulce, ésto no concuerda con lo establecido por Simon & Wünsch (1998) quienes indican, que las temperaturas de la época de verano controlan el crecimiento del bacterioplacton en zonas profundas de la columna de agua, este aumento de temperatura según Madigan *et al.*, (1998) permitiría que las

reacciones químicas y enzimáticas de las células se produzcan a un ritmo más rápido y el crecimiento se acelere. Trabajos realizados por Proenca (1990) en la región estuarina de Laguna dos Patos en Brasil, confirman que el patrón estacional es fundamental en la producción primaria, de biomasa, de estructura y de disponibilidad de nutrientes para las comunidades bacterianas, explicando porque tendrían que ser mayores los recuentos poblacionales en las muestras de agua dulce.

Por su parte, para las muestras de agua y sedimento salado se cuantificaron en el muestreo de invierno  $600.000 \times 10^3$  ufc  $\text{mL}^{-1}$  y  $82 \times 10^3$  ufc  $\text{g}^{-1}\text{sed.}$  desde el agua y sedimento respectivamente. En primavera no se cuantificaron poblaciones bacterianas desde agua salada y para las muestras de sedimento salado se cuantificaron  $30 \times 10^3$  ufc  $\text{g}^{-1}\text{sed.}$  En el muestreo de verano se determinaron  $3,1 \times 10^3$  ufc  $\text{mL}^{-1}$  y  $6.100 \times 10^3$  ufc  $\text{g}^{-1}\text{sed.}$  desde agua y sedimento salado respectivamente. Recuentos bacterianos de agua y sedimento salado han sido descritos entre otros por Garay, (2003); Madigan *et al*, (1998) y Rheinheimer, (1987) ellos determinaron que se pueden registrar en el sedimento costero altas concentraciones de bacterias, cantidades que varían entre  $286.300 \times 10^1$  ufc/g.sed. a  $220 \times 10^1$  ufc/g.sed., esto se debe al aporte de nutrientes provenientes desde los ríos. Esto no ocurre en la época de invierno en el presente estudio donde las mayores concentraciones de bacterias se encuentra en el agua salada, esto podría deberse a que las muestras de agua del muestreo de invierno se caracterizan por ser mas oxigenadas, con mayor temperatura de fondo y aporte de nutrientes inorgánicos ( $\text{NO}_3$ ), según lo señalado por Garay (2003), también por ser áreas donde los vientos y corrientes provocan afloramiento del agua profunda del océano y llevan así nutrientes a la superficie.

## **5.2 Recuento de poblaciones bacterianas pigmentadas desde muestras de agua y sedimentos dulce y salado.**

En el muestreo de invierno, desde muestras de sedimento dulce se determinó un total de  $15 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. y no se registraron poblaciones de bacterias pigmentadas, desde muestras de agua dulce. En el muestreo de primavera se determinaron  $700.000 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. y  $8 \times 10^3$  ufc  $mL^{-1}$  desde muestras de sedimento y agua dulce respectivamente. En el muestreo de verano se determinaron  $21 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. y  $55.000 \times 10^3$  ufc  $mL^{-1}$ , desde muestras de sedimento y agua dulce respectivamente. En este caso para las bacterias cromógenas la intensidad luminosa es un factor importante para su desarrollo, así como bacterias del género *Chromobacterium* pueden absorber longitudes de onda hasta los 260nm, como establece Rheinheimer (1987) las bacterias incoloras sufren una inhibición a causa de la luz, por eso que en primavera y verano (ver anexo 2, tabla 4, para parámetros climáticos del lugar de estudio) y de acuerdo a lo determinado por Egan & Floodgate (1984) y De Lange *et al*, (2003) existe un predominio de bacterias pigmentadas, tanto para las muestras de agua como sedimento dulce, presentándose mayores incrementos en la superficie de la columna de agua, donde tienen una mayor radiación solar. En el muestreo de invierno las poblaciones de bacterias pigmentadas en las muestras de agua se encuentran disminuidas o no se presentan; al respecto Marcano (2000) señala que la radiación solar que penetra en las aguas en éste periodo se ve afectada por factores como: el porcentaje de nubosidad, influyendo que la penetración de la luz sea menor, disminuyendo así la proporción de bacterias pigmentadas.

Para las muestras de agua y sedimento salado en el muestreo de invierno se cuantificaron  $7.200 \times 10^3$  ufc  $mL^{-1}$  y  $20 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. desde muestras de agua y sedimento salado respectivamente. En primavera y verano, no se cuantificaron poblaciones de bacterias pigmentadas desde muestras



de agua salada. En primavera se cuantificaron  $5.100 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. y en verano  $88 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  sed. desde muestras de sedimento salado. Los recuentos de bacterias pigmentadas para las muestras de agua salada del muestreo de invierno son mayores que los registrados para el muestreo de primavera y verano. Esto podría deberse a que las muestras de agua salada del muestreo de invierno se caracterizaron por estar relacionadas con una disminución en la salinidad del agua, debido a que la época de invierno es lluviosa, provocando que las concentraciones bacterianas se vean afectadas (ver anexo 2, tabla 1, para valores de salinidad), estudios realizados por Botello (1977) en el Golfo de México, demuestran que la salinidad decrece, presentándose valores mas bajos de 30‰, disminuyendo a su vez los niveles de  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $SO_4^-$  y  $HCO_3^-$ . Por su parte, para las muestras de sedimento salado se indicó que las mayores poblaciones bacterianas pigmentadas fueron determinadas en primavera y verano, coincidiendo con lo señalado por Egan & Floodgate (1984) que indican, que las altas temperaturas de éstas épocas (  $22.2^\circ C$ ) provocarían un aumento de bacterias pigmentadas en sedimentos salados, debido a que las capas de sedimento costero, en éstas épocas estivales, alcanza mayores temperaturas en su superficie, ya que recibe en forma intensa la radiación solar permitiendo un aumento en la concentración de bacterias cromógenas, ya que pueden resistir de buena forma la radiación y, a su vez, que se multipliquen de forma más rápida con temperaturas cálidas.

### **5.3 Taxonomía de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de agua dulce y salada.**

En el presente estudio, las 90 cepas bacterianas pigmentadas aisladas desde muestras de agua dulce, se clasificaron taxonomicamente en 7 géneros, siendo los géneros *Alteromonas*, *Flexibacter* y *Flavobacterium* los que se aislaron con mayor frecuencia, bacterias pertenecientes a estos mismos géneros han sido descritos por Silva (2002) a partir de muestras de agua dulce

desde el Lago Budi de la IX Región de Chile. De los géneros determinados en el presente estudio, *Alteromonas*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus*, *Flexibacter* y *Micrococcus* coinciden con lo que establece Garcia- Tello (1985) y Weiss *et al* (1996) quienes determinaron que mayoritariamente los géneros antes citados fueron aislados desde muestras de agua. Además, éstos mismos autores indicaron que entre las formas más comunes de bacterias encontradas en forma libre en el agua se cuentan los bacilos gran negativos no esporulados, los que también coinciden con el presente estudio. También en el presente estudio géneros como *Cytophaga* fueron determinados en muestras de agua dulce y según Kirchman (2002), *Cytophaga* se ha agrupado en el complejo *Cytophaga – Flavobacteria* por ser quimiorganótrofos y especialmente eficientes en degradar varios polímeros, tales como celulosa, quitina y pectina. Según Cipriano (1996) una especie de *Flavobacterium* está asociada a enfermedades de algunos peces, junto a *Flexibacter* y *Cytophaga*, infectando únicamente a peces de agua dulce.

Los representantes del genero *Micrococcus*, son habitantes acuáticos comunes, esto ha sido determinado por Garcia – Tello (1985) y Reinheimer (1987), algunas especies de *Micrococcus* se encuentran también asociados a desperdicios de productos pesqueros. Especies de éste género presentan colonias pigmentadas como, *Micrococcus luteus* de color amarilla y *Micrococcus roseus* que produce colonias rojas (Smith *et al*, 1999). Si bien es cierto, todos los géneros antes mencionados presentan coloración, siendo ellos aislados solamente en épocas de primavera y verano, donde es mas frecuente que las bacterias con pigmentos ejerzan un efecto protector frente a las radiaciones de la luz y del ultravioleta próximo (Schelegel, 1997).

En lo que respecta a las cepas de bacterias pigmentadas (180) aisladas desde muestras de agua salada, se agruparon en 7 géneros, predominando *Flavobacterium* y *Micrococcus*, siendo también

descritos por Garay (2003) a partir de agua salada desde fiordos y canales de la XI Región de Chile. Es común que *Micrococcus* se presente en un alto porcentaje, pues requiere más de 5% de NaCl para crecer. Otros géneros que se presentan en agua salada con menor presencia son: *Alteromonas* y *Chromobacterium*. Del género *Chromobacterium* destaca *Chromobacterium violaceum*, característico por producir el pigmento llamado violaceína, que da a las colonias un brillo púrpura metálico oscuro distintivo. Estudios realizados por Karibi-Ikiriko (2002) indican que el pigmento producido por esta bacteria han demostrado características antibióticas, particularmente contra amebas y Tripanosomas del suelo. Según Starr *et al* (1981) citado por Garay (2003) *Chromobacterium* es frecuentemente aislado en invierno, debido a las fuertes lluvias que erosionan los suelos, esto concuerda con el presente estudio, ya que fue aislado solo en la temporada de invierno. El género *Alteromonas* se encuentra presente en la mayor parte de los hábitat marinos, con temperaturas templadas, según lo establecido por Ivars – Martinez *et al.*, (2005), es por eso, que en las épocas de descenso de temperaturas este género disminuye notoriamente. Al igual que las colonias de bacterias pigmentadas aisladas desde agua dulce. En agua salada también predominan los Gram negativos coincidiendo con lo descrito por Reinheimer (1987), quien señala que, la mayoría de las bacterias marinas son Gram negativas, similares resultados también son reportados por Schadebrodt (1983) quien informó que, en los sectores de El Canelo, Las Balizas, Las Coloradas de Corral, los porcentajes de bacterias Gram negativas son: 77.7, 71 y 74% respectivamente.

#### **5.4 Taxonomía de bacterias pigmentadas aisladas desde muestras de sedimento dulce y salado.**

Según Garcia – Tello (1985) en fondos fangosos predominan bacilos esporulados aerobios y anaeróbios Gram positivos. En el presente estudio no se registraron altos porcentajes de bacterias Gram positivas en sedimento dulce y salado, esto se debe a que solo se rescataron las bacterias que presentaban pigmentación, encontrándose para muestras de sedimento dulce los géneros *Flavobacterium* y *Chromobacterium* que son Gram negativos no esporulados. Por otra parte, las poblaciones bacterianas Gram negativas (*Flavobacterium* y *Chromobacterium*) fueron el porcentaje predominante en muestras de sedimento dulce, *Flavobacterium* se encuentra ampliamente distribuidas en suelos (Delgado, 2005), que al igual que *Chromobacterium* son habitantes normales de los suelos en general, este último género pigmentado sólo fue aislado en la época de invierno. Otra taxa Gram negativa aislada en menor porcentaje correspondió a *Flexibacter*, también descrito por Garay (2003), presentando pigmentación amarilla, rosas y anaranjadas.

Las 90 cepas bacterianas aisladas desde sedimento dulce se agruparon en 8 géneros y las 180 cepas bacterianas aisladas desde sedimento salado en 6 géneros, de los cuales *Cytophaga*, *Cellulomonas* y *Flavobacterium* se concentraron las mayores poblaciones pigmentadas, y *Chromobacterium* solo se registró en primavera con un porcentaje muy bajo de poblaciones bacterianas (Ver figura 8G). A diferencia del sedimento dulce en el sedimento salado no se registro el género *Micrococcus*. Según Holt *et al* (1994) los géneros *Cytophaga* y *Cellulomonas* se encuentran distribuidas en hábitat marinos, suelos y materia vegetal, caracterizados por descomponer aeróbicamente materia orgánica como celulosa.

Finalmente, debido a que las bacterias pigmentadas requieren diversos factores físico – químicos, para poder sintetizar sustancias coloreadas, regular su crecimiento y protección, según lo establecido por Church *et al* (2000) y Schlegel, (1997), hace que sea imprescindible que la temperatura, pH, salinidad y luminosidad cumplan un rol fundamental en la distribución cuali y cuantitativa de las bacterias cromógenas en los cuerpos de agua y sedimento.

## 6. CONCLUSIONES

1. La mayor población bacteriana heterótrofa psicrófila viables ( $7.000.000 \times 10^3$ ) y la mayor población de bacterias cromógenas ( $700.000 \times 10^3$ ), se determinaron a partir de las muestras de sedimento dulce recolectada durante primavera.
2. Independiente de la estación de muestreo, del tipo de muestra y de la época de recolección, predominaron las bacterias de forma bacilar Gram negativas (56.1 %), de los cuales, los géneros *Alteromonas* y *Flexibacter* fueron los más representativos.
3. La mayor diversidad de taxa de bacterias pigmentadas Gram positivas (2), se determinó en muestras de agua salada recolectadas durante el invierno.
4. Con respecto a la relación de los parámetros físico – químicos versus poblaciones bacterianas pigmentadas, independiente del lugar y época de muestreo, las mayores poblaciones correspondieron a muestras de agua salada ( $17.000.000 \times 10^3$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) encontrándose los menores valores de temperatura ( $10^\circ\text{C}$ ), pH (5,5) y salinidad (15 S‰), y las menores poblaciones correspondieron a las muestras de agua dulce ( $8 \times 10^3$  ufc mL) encontrándose los valores mas altos de temperatura y pH.

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre las poblaciones bacterianas pigmentadas desde muestras de agua y sedimento dulce y salado, la hipótesis del presente estudio se rechaza.

## 7. LITERATURA CITADA

Alcocer, J. (2005). Biodiversidad y los lagos salinos. [ en linea].

[http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/lagos.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/lagos.html)

Beja, O., Suzuki, M., Heidelberg, J., Nelson, W., Preston, C., Hamada, T., Eisen, J., Fraser, C. & Delong, E. (2002). Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. Monterey Bay Aquarium Research Institute, California, USA. 415:630-633.

Botello, A. (1974). Variación de los parámetros hidrológicos en las épocas de sequía y lluvias (Mayo y Noviembre de 1974) en la Laguna de Términos, Campeche, México. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Laboratorio de Química Marina y Contaminación. 1:93-97.

Church, M., Hutchins, D. & Ducklow, H. (2000). Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the southern ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2): 455-466.

Cipriano, R. (1996). Estudio epizootológico de la enfermedad bacterial de agua fría en el salmón pacífico y mas caracterización del agente etiológico, *Flexibacter psychophila*, Diario de la salud Animal Acuático. 8: 28-36.

Comarck, W. (2002). Evaluación de los efectos directos e indirectos de la radiación UV sobre las comunidades bacterianas antárticas. (Proyecto en cooperación con la Universidad de Buenos Aires) [en línea]. <http://www.dna.gov.ar/CIENCIA/BIO1.HTM>. Fecha de consulta 18-09-2005.

Davies, C., Long, J., Donald, M. & Ashbolt, N. (1995). Survival of fecal microorganisms in marine freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1888-1896.

De Lange, H., Morris, D. & Williamson, C. (2003). Solar ultraviolet photodegradation of DOC may stimulate freshwater food webs. Department of Earth and Environmental Sciences, Lehigh University, USA. 25:111-117.

Delgado, J. (2005). Actividad Microbiana: Un indicador integral de la calidad del suelo. Universidad Nacional de Colombia-Palmira. 43:5-6.

Egan, B. & Floodgate, G. (1984). Bacterial biomass at sea water discontinuities. *Bacteriologie Marine. Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique.* Université de Provence. París. 229p.

Garay, Y. (2003). Determinación cuali-cuantitativa de bacterias heterótrofas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, calidad bacteriológica de agua y sedimentos recolectados en fiordos y canales de la XI región de Chile. Tesis de Pregrado. Escuela de Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 72p.



García – Tello, P. (1985). Microbiología Marina. Impreso por oficina regional de Ciencia y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe. 83p.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>o</sup> Ed. Baltimore, USA. 787p.

Ibáñez, E. (1998). Acción de los agentes físicos sobre las bacterias II. Curso de Microbiología general. [ en línea]. [http://faci.unne.edu.ar/biología/migrogeneral/micro-iazez/18\\_micro.htm#ph](http://faci.unne.edu.ar/biología/migrogeneral/micro-iazez/18_micro.htm#ph). Fecha de consulta 18-09-2005.

Ivars- Martínez, E., D'Auria, G. Tauburini, C., López- López, A. & Rodríguez- Valera, F. (2005). Caracterización de aislados de profundidad y superficie del microorganismo *Alteromonas macleodii*. [ en línea ] <http://micelio.unex.es/sem2005/comunicaweb/H166.htm>. Fecha de consulta 23-10-2005.

Karibi- Ikiriko, A. (2002). *Chromobacterium violaceum*. [ en línea ] [http://216.239.37.104/translate\\_c?hl=es&sl=en&u=http://web.umn.edu/microbio/BIO22](http://216.239.37.104/translate_c?hl=es&sl=en&u=http://web.umn.edu/microbio/BIO22). Fecha de consulta 03-12-2005.

Karl, D. (2002). Microbiological oceanography: Hidden in sea microbes. School of Ocean and Earth Science and Technology, University of Hawaii, Honolulu, USA. 415:590-591.

Kirchman, D. (2002). The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. FEMS. Microbiology Ecology. 39:91-100.

Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (1998). Biología de los microorganismos. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 986p.

Mancilla, C. (2003). Aislamiento, Caracterización y Actividad Antimicrobiana de la Microbiótica Bacateriana de Agua y Sedimentos Marinos de la Costa de Valdivia. Tesis, Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 52 p.

Marcano, J. (2000). Ecología de las aguas dulces. Educación Ambiental. Elementos de Ecología II parte. [ en línea] [www.jmarcano.com/nociones/fresh1.html](http://www.jmarcano.com/nociones/fresh1.html). Fecha de consulta 08-01-2006.

Pausz, C. & Herndl, G. (2002). Role of nitrogen versus phosphorus availability on the effect of UV radiation on bacterioplankton and their recovery from previous UV stress. Department of Biological Oceanography, Royal Netherlands Institute for Sea Research. The Netherlands 29:89-95.

Proenca, L. (1990). Ciclo anual de producción primaria, biomasa de fitoplacton y carbono orgánico particulado en área de Laguna dos Patos. Tesis de Maestría, Universidad de Río Grande, FURG, Río Grande- RS. 114p.

Quintana, D., Boix, D., Badosa, A., Brucet, S., Gascón, S., Gesti, J., Lopez, R., Pou-Rovira, Q., Trobajo, R. & Moreno, R. (2004). Limnología de los humedales costeros mediterráneos. El caso de Aiguamolls de l' Empordá. Instituto de Ecología Acuática y Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad de Girona. España.

Rheinheimer, G. (1987). Microbiología de las aguas. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza. 299p.

Romero, J., Ferrara, M., Lizarraga, L & Rodríguez, H. (1985). Variación estacional de las poblaciones de enterobacterias en la Laguna de Términos, Campeche, México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México 23:73-83.

Sánchez, A. & Morales, R. ( 2000). Las regiones de Chile. Ed. Universitaria, S. A. 262 p.

Schadebrodt, G.(1983). Calidad bacteriológica del agua de la Bahía de Corral, en áreas de producción de Mitilidos. Tesis, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. 36p.

Schelegel, H. (1997). Microbiología General. Ed. Omega, Barcelona.654p.

Schultz, G., White, E. & Ducklow, H. (2003). Bacterioplakton dynamics in the York River estuary: primary influence of temperature and freshwater inputs. University Galveston, Texas, USA. 30:135-148.

Silva, A. (2002). Caracterización bacteriana del lago Budi (IX Región, Chile), con énfasis en el aislamiento de bacterias del ciclo de nitrógeno. Tesis, Escuela de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 80p.

Simon, M. & Wünsch, Ch. (1998). Temperature control of bacterioplankton growth in a temperate large lake. *Aquatic Microbial Ecology*. 16: 119-130.

Smith, K., Neafie, R., Yeager, J. & Skelton, G. (1999). *Micrococcus* folliculitis in HIV- 1 disease. *British Journal of Dermatology*. British Association of Dermatologists. 141 (3): 558-561.

Stuardo, J., Valdovinos. C., Figueroa, R. & Occhipinti, A. (1993). Gestión de los Recursos Hídricos de la cuenca del Río Biobio y del área costera adyacente. Programa interuniversitario de Investigación Científica Aplicada y Formación, Ministerio de Planificación y Cooperación de la Republica de Chile, 157p.

Weiss, P., Schweitzer, B., Amann, R. & Simon, M. (1996). Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregater (lake snow). *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (6): 1998-2005.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

Preparación de medios de cultivos y reactivos.

a) Agar Celulosa:

Celulosa	40 g.
Nitrato de amonio	1 g.
Solución salina estandar	50 mL.
Agar noble	20 g.
Agua destilada	1000 mL.

Se mezclan los ingredientes y luego se esteriliza a media atmósfera (121°C) por 20 minutos.

b) Agar Hugh Leifton:

Agar Hugh Leifton	11 g.
Glucosa	100 mL.
Agua destilada	1000 mL.

Autoclavar el agar al alcanzar los 50 °C se le agrega la glucosa filtrada por millipore.

c) Agar Marine Broth:

Marine Broth	37.4 g.
Agar-agar	20 g.
Agua destilada	1000 mL.

Se mezclan los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121°C) por 15 minutos.

## d) Agar Nitrato:

Peptona	10 g.
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$	1 g.
Glucosa	0.5 g.
Agar-agar	2 g.
$\text{KNO}_3$	0.5 g.
Agua destilada	1000 mL.

Se deja remojar el agar por 3 a 4 horas, luego se mezclan los demás ingredientes y se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

## e) Agar peptona:

Extracto de carne	3 g.
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g.
Peptona	10 g.
Agar-agar	20 g.
Agua destilada	1000 mL.

Se mezclan los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

## f) Agar peptona adicionado con NaCl al 7 %:

Extracto de carne	3 g.
Cloruro de sodio (NaCl)	70 g.
Peptona	10 g.
Agar-agar	20 g.
Agua destilada	1000 mL

Se mezclan los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

## g) Caldo glucosado:

Medio MR-VP	17g.
Agua destilada	1000 mL

Se mezclan los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

## h) Caldo peptona:

Extracto de Carne	3 g.
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g.
Peptona	10 g.
Agua destilada	1000 mL

Se mezclan los ingredientes y luego se esteriliza a 1 atmósfera (121 °C) por 15 minutos.

## i) Gelatina:

Extracto de carne	3 g.
Peptona	5 g.
Gelatina	120 g.
Agua destilada	1000 mL.

Se deja remojar la gelatina por 15 a 30 minutos y luego licuar a 50 °C. Se agregan los demás ingredientes y disolver a 75 °C, luego se esteriliza a 12° y 15°.

## j) Reactivo de Barrit:

Solución A: Naftol 5% + Alcohol etílico

Solución B: KOH al 40%

Se mezclan independientemente los ingredientes de cada solución y luego se agitan, conservar en la oscuridad y a temperatura ambiente.



## k) Reactivo de Kovac:

P-dimetilamina benzaldehido	50 g.
Alcohol amílico o butílico	750 mL
Ácido clorídrico concentrado	

Se mezclan los ingredientes, luego se agita, conservar en la oscuridad y a temperatura ambiente.

## l) Reactivo Nitrato:

Solución A: Ácido sulfanílico	0.8 g.
Ácido acético 5N	100 mL.
Solución B: Alfa naftilamina	0.5 g.
Ácido acético 5N	100 mL.

Se mezclan en forma independiente cada solución luego se agitan, conservar en la oscuridad y a temperatura ambiente.

## m) Reactivo rojo de metilo:

Rojo de metilo	0.8 g.
Alcohol etílico 95%	1000 mL.
Agua destilada	1000 mL.

Se mezclan los ingredientes, luego se agita, conservar en la oscuridad y a temperatura ambiente.

## ANEXO 2

**Tabla 1.** Parámetros físico – químicos de las muestras de agua y sedimento dulce y salado para la época de invierno.

TEMPERATURA (°C)				pH				SALINIDAD (S ‰)			
AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO	
Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado
12	10	12	10	4.7	5.5	5.0	5.8	0	15	0	15

**Tabla 2.** Parámetros físico – químicos de las muestras de agua y sedimento dulce y salado para la época de primavera.

TEMPERATURA (°C)				Ph				SALINIDAD (S ‰)			
AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO	
Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado
15	14	15	15	5.3	5.8	5.2	5.7	0	15	0	15

**Tabla 3.** Parámetros físico – químicos de las muestras de agua y sedimento dulce y salado para la época de verano.

TEMPERATURA (°C)				pH				SALINIDAD (S ‰)			
AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO	
Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado
12	16	12	12	5.0	6.0	5.3	5.5	0	18	0	18

**Tabla 4.** Parámetros climáticos del lugar de estudio

EPOCA DE MUESTREO	TEMPERATURA (°C)		LUMINOCIDAD		
	MAXIMA	MÍNIMA	PAR μE/m <sup>2</sup> /s	UVB 1 μW/cm <sup>2</sup>	UVB 2 μw/cm <sup>2</sup>
INVIERNO	12.8	5.3	1115,67158	66,3645	140,416
PRIMAVERA	22.2	9.3	2464,7586	158,6312	300,1631
VERANO	19.9	2.3	2144,1573	149,5533	276,0788

### ANEXO 3

**Tabla 1.** Población bacteriana heterótrofa psicrófila viable ( ufc/mL o g de muestra), por periodo de muestreo.

MEDIOS DE CULTIVOS	INVIERNO		PRIMAVERA		VERANO	
	AGUA	SEDIMENTO	AGUA	SEDIMENTO	AGUA	SEDIMENTO
AGAR PEPTONA	0	523	371	170	93	181
A.P + NaCl al 7%	132	82	0	0	65	53
MARINE BROTH	102	75	0	417	31	210
<b>TOTAL</b>	234	680	371	587	189	444

**Tabla 2.** Población de bacterias pigmentadas( ufc/mL o g de muestra), por periodo de muestreo

MEDIOS DE CULTIVOS	INVIERNO		PRIMAVERA		VERANO	
	AGUA	SEDIMENTO	AGUA	SEDIMENTO	AGUA	SEDIMENTO
AGAR PEPTONA	0	395	80	220	55	240
A.P + NaCl al 7%	72	371	0	0	0	0
MARINE BROTH	102	267	0	293	0	288
<b>TOTAL</b>	174	1033	80	513	55	528

**Tabla 3.** Número de géneros identificados a partir de muestras de agua y sedimento dulce y salado para los tres periodos de muestreo.

GENERO	INVIERNO				PRIMAVERA				VERANO			
	AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO		AGUA		SEDIMENTO	
	Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado	Dulce	Salada	Dulce	Salado
<i>Alteromonas</i>	0	6	0	8	22	0	5	15	32	0	3	3
<i>Cellulomonas</i>	0	14	8	4	14	0	8	0	8	0	4	12
<i>Chromobacterium</i>	0	2	10	0	0	0	0	4	0	0	0	0
<i>Cytophaga</i>	0	0	5	17	16	0	0	18	0	0	2	6
<i>Flavobacterium</i>	0	20	0	0	8	0	3	15	24	0	12	0
<i>Flectobacillus</i>	0	10	8	8	14	0	10	0	0	0	9	3
<i>Flexibacter</i>	0	12	3	9	20	0	8	10	14	0	4	6
<i>Micrococcus</i>	0	18	8	0	12	0	0	0	14	0	12	0