

## **CARGA Y DIVERSIDAD MICROBIANA EN AIRE AMBIENTE DE SECTORES DE LA REGIÓN DEL GRAN LA PLATA**

Negrin, M\*; Blasetti, N; Del Panno, M.T<sup>2</sup>; Ronco, A<sup>1</sup>.

\*Becario CIC;<sup>1</sup>CIMA, <sup>2</sup>CINDEFI, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET.

cima@quimica.unlp.edu.ar

Se evaluó la concentración y diversidad de bioaerosoles (hongos y bacterias cultivables) en aire ambiente de la región del Gran La Plata, Provincia de Buenos Aires. Se extrajeron muestras en dos períodos estacionales (invierno y primavera 2005) diferenciando sectores urbanos, industriales, residenciales y rurales en un área aproximada de 25 km<sup>2</sup>. Los muestreos se realizaron utilizando un método de captación forzada sobre medios selectivos para poblaciones bacterianas oligotróficas y hongos heterótrofos. La caracterización de hongos se realizó mediante observación microscópica hasta nivel de género. Las poblaciones bacterianas se analizaron por extracción de DNA y posterior amplificación del fragmento 16S rDNA mediante la reacción PCR con los iniciadores 341f y 907r. Utilizando la técnica de DGGE se obtuvo el perfil de bandas correspondiente a las poblaciones predominantes de cada sector, luego analizadas mediante taxonomía numérica. Los resultados mostraron un predominio en la concentración de bacterias respecto a hongos, sin evidenciar significativas diferencias entre los sectores seleccionados. Los hongos evidenciaron un predominio estacional (primavera), con prevalencia de *Cladosporium* sp. En total fueron determinados 18 géneros fúngicos. Se observó elevada diversidad poblacional bacteriana en cada sector estudiado. Se destaca la importancia que reviste la caracterización de bioaerosoles en la zona, tanto por la contribución al conocimiento sobre el diagnóstico de la calidad de aire en la zona, como por las implicancias que reviste sobre la salud ambiental.

### **1. Introducción**

Contrariamente a la atención puesta por microbiólogos ecologistas en los demás compartimentos de la biosfera, la atmósfera sigue siendo insuficientemente considerada en cuanto a estudios destinados a la caracterización de la diversidad microbiana y la evaluación de su importancia en el funcionamiento del ecosistema.

Hasta el momento, los bioaerosoles (conjunto de microorganismos o partes de los mismos de origen fúngico, vegetal, animal o bacteriano en suspensión en aire) han sido predominantemente estudiados en el marco de su toxicidad y de su relevancia asociada a problemas de salud humana. En este sentido cabe citar estudios realizados en espacios intramuros como hospitales (Baur y col., 1990), granjas de producción animal (Thorne y col., 1992), escuelas y ambientes domiciliarios (Wan-kuen Jo y Young-Jun Seo, 2005). Los estudios realizados en espacios extramuros (aire ambiente) abarcan entre otros ambientes de características urbanas (Jones y Coochson, 1983), rurales (Adhikari y col., 2003) e industriales (Dutkiewicz y col., 2001) y representan importantes vías de colonización y de transmisión de patógenos a través de grandes áreas. En este sentido cabe destacar que el estudio de las comunidades de microorganismos en espacios extramuros resulta de interés por las siguientes razones: 1- La identificación de los organismos podría indicar la fuente, nivel y el tipo de contaminación ambiental. 2- El análisis de las variaciones en densidad, estructura génica y composición a través del tiempo y espacio debería constituir un modo importante para mejorar nuestros conocimientos de la ecología microbiana y del funcionamiento del ecosistema en su totalidad.

Los mayores inconvenientes sobre los estudios de bioaerosoles, y razón también de resultados controversiales, han radicado en las metodologías de captación y las determinaciones microbiológicas posteriores. En lo referente a metodologías de captación, los resultados de estos pueden variar de manera importante según el principio del método de recolección (Henningson y Ahlberg, 1994), resultando un factor decisivo en la elección del muestreador, el tipo de microorganismo y el estado de los mismos (viable-no viable, cultivable-no cultivable) que se pretende poner de manifiesto, ya que cada equipo ponderará unos por encima de otros. Como resultado de ello las investigaciones muchas veces se ven limitadas a estudiar alguna de estas variables.

Las técnicas microbiológicas convencionales para detectar material cultivable son laboriosas y varían según el tipo de microorganismo considerado. Un factor decisivo lo constituye la

selección del medio de cultivo adecuado para muestras ambientales complejas. Las colonias crecidas en medios de cultivos a partir de esporas de hongos pueden determinarse según caracteres morfológicos por microscopía óptica, en cambio los cultivos bacterianos deben ser estudiados según procedimientos laboriosos y prolongados, con gran demanda de tiempo cuando se trata de numerosos organismos. El uso de técnicas en base a DNA para el análisis de muestras ambientales complejas, ha resultado una herramienta capaz de reducir los tiempos de modo sustancial y como consecuencia de ello, es cada vez mayor el número de trabajos que las incorporan.

El objetivo del presente estudio ha sido el de iniciar la caracterización de la carga y diversidad de hongos y bacterias cultivables en aire ambiente en cinco zonas de la región del Gran La Plata Provincia de Buenos Aires, con diferente tipo de influencia (urbana, industrial, rural, residencial, mixta), en el marco de un plan de investigación asociado a estudios de calidad de aire en la zona.

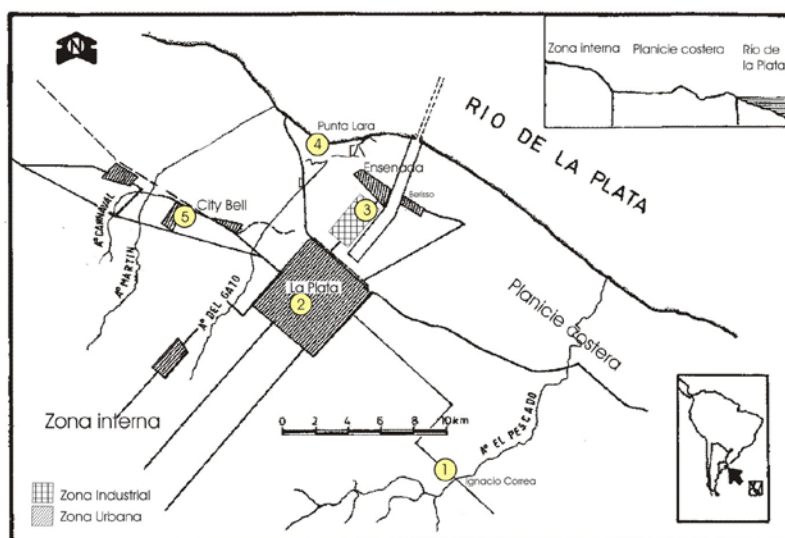
**2. Materiales y métodos:** Tanto los muestreos como la caracterización en laboratorio sigue métodos modernos de diagnóstico ambiental, los que se detallan a continuación.

**2.1. Selección de sitios y condiciones de muestreo**

Los muestreos se realizaron en la región del Gran La Plata (Provincia de Buenos Aires), en un total de cinco sitios representativos de zonas urbanizadas, residenciales, industriales y rurales, cubriendo un área total de 25 km<sup>2</sup> (Figura 1). En la selección de los sitios se tuvieron en consideración aquellos aspectos que podrían ejercer un potencial influjo sobre la carga y distribución de comunidades microbianas, los mismos se encuentran resumidos en la Tabla 1. El muestreo se realizó en dos momentos estacionales (invierno y primavera) durante el transcurso del año 2005. Las muestras de bioaerosoles se recolectaron sobre placas de Petri utilizando un impactador SKC inc. provisto de 400 orificios de 0,25 mm ( $D_{ae50} = 0,68 \mu m$ ) a un flujo constante de 28,3 l min<sup>-1</sup>, con una duración de 1,5 min en invierno y 2 min en primavera, según carga microbiológica estimada preliminarmente. En todos los casos las muestras fueron extraídas a una altura de 1,5 mts sobre el suelo entre las 8 h y 13 h, a fin de minimizar la variabilidad diaria atribuible a las condiciones atmosféricas (Jones y Harrison, 2004). Las placas fueron suplementadas con 20 ml de los medios selectivos Diclorán-Glicerol 18% (DG-18) y R2 Agar para el cultivo de hongos y bacterias de respectivamente. Estos medios son frecuentemente utilizados para el cultivo de muestras de ambientes mesofílicos y mostraron resultados satisfactorios durante un muestreo preliminar comparativo. Para evitar la contaminación cruzada, a los medios DG-18 y R2 Agar se adicionaron Estreptomicina (25 mg%) y Ciclohexitida (25 mg%), respectivamente. Como resultado de ambos momentos de muestreo se recolectaron un total de 35 muestras de bacterias y 30 muestras de hongos, las

cuales fueron cultivadas en estufa a 30°C por intervalo de 5 y 7 días respectivamente.

Figura 1. Localización de sitios de muestreo en la región del Gran La Plata.



**Tabla 1. Características distintivas de los sitios de muestreo.**

Sitio	1. Área semirural	2. Área Urbana	3. Área Industrial	4. Área Residencial	5. Área Residencial
Características	Zona semirural con presencia de campos de pastoreo y de explotación agrícola; presencia de parcelas anegadizas. Escasamente poblada. Baja densidad arbórea.	Zona densamente poblada. Atmósfera típicamente urbana caracterizada por la presencia de contaminantes de origen vehicular. Parquización moderada con predominio de vegetación arbórea exótica.	Presencia de importante polo petroquímico. Predominio de contaminantes atmosféricos de origen industrial. Medianamente poblada. Parcelas de pastizales y arboledas de Eucaliptos.	Zona costera al Río de la Plata. Vegetación dominada por la presencia de pastizales y relictos de selva marginal rioplatense. Escasamente poblada.	Zona típicamente residencial. Parquización dominada por vegetación arbórea exótica. Presencia de vías de acceso de elevado tránsito vehicular.

### 2.2. Recuento e identificación de poblaciones fúngicas

Luego de la incubación se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias por  $m^{-3}$  (UFC  $m^{-3}$ ). Los géneros de hongos fueron identificados por reconocimiento de sus características micro- y macromorfológicas mediante clave taxonómica. Las colonias que no mostraron esporulación al séptimo día, fueron aisladas en DG18 e incubadas durante 21 días, período después del cual las colonias aún no fructificadas se consideraron como no identificables.

### 2.3 Extracción de DNA bacteriano

Luego del período de incubación, la superficie de las placas de cada muestra, fueron resuspendidas y homogeneizadas por lavado de la superficie con 5 ml de solución fisiológica (NaCl 0,85g%) a partir de la cual se tomó 1 ml para la extracción. El DNA genómico fue extraído utilizando el protocolo de extracción descrito por Kuske (Kuske y col., 1997).

### 2.4 Amplificación mediante PCR

Se utilizaron los primers 341fGC y 907r (Muyzer y col., 1993, 1998) para la amplificación del fragmento 626-pb del 16S-rDNA. La reacción de polimerización contenía 1  $\mu$ l DNA molde, 1 U de GoldTaq, en el buffer recomendado por el fabricante de la enzima polimerasa, 200 mM de BSA o Albúmina, 0,4 mM dNTP y 20 pM de cada primer en un volumen final de 50  $\mu$ l. La amplificación se llevó a cabo en un equipo Progene FPROGO5Y (Techne, Burlington, NY, USA). El programa incluyó un paso inicial desnaturante de 4 min a 95°C, un segundo paso de 30 seg a 94°C, 45 seg a 62°C, y un min 72°C (10 ciclos), seguido de un tercer paso de 30 seg a 94°C, 40 seg a 57°C, y un minuto a 72°C (25 ciclos), mas una extensión final de 10 min a 72°C.

### 2.5. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Se utilizó un equipo BioRad D GENE System (BioRad, Munich, Germany). Los productos PCR fueron directamente aplicados sobre geles de poliacrilamida (6% p/vol), preparados a partir de solución stock (acrilamida-N', N'-metilbisacrilamida, 37,5:1). El gel se preparó a partir de una solución con gradiente desnaturante lineal de 30 a 65% (100% desnaturante se corresponden a urea 7M y 40% (vol vol<sup>-1</sup>) formamida). La electroforesis se realizó en un medio TAE buffer 1X (20mM Tris acetato (pH 7,4), 10 mM acetato de sodio y 0,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA), a una temperatura de 60°C y una corriente constante de 100 voltios durante 16 h. Luego de la corrida las bandas fueron detectadas en una solución de Bromuro de Etidio y digitalizadas y almacenadas como archivos TIF utilizando cámara fotográfica digital bajo luz UV.

### 2.6. Análisis de geles.

Los geles obtenidos por DGGE fueron analizados utilizando el software GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Se determinaron las densidades ópticas de las bandas y se transformaron en densitogramas. Estos perfiles de densidades sirvieron como base para el cálculo de una matriz de similitud utilizando la Correlación de Jaccard. El dendrograma se calculó por UPGMA (Sokal y Michener, 1958).

### 3. Resultados

#### 3.1. Concentración de las poblaciones bacterianas y fúngicas.

En la figura 2. se muestran los valores medios de las concentraciones de bacterias y hongos totales determinados en los distintos sitios. Las concentraciones de bacterias oscilaron entre 425-4169 UFC m<sup>-3</sup> en invierno y entre 848-5017 UFC m<sup>-3</sup> en primavera, no mostrando un incremento en la carga entre estaciones. Respecto de los sitios se puede observar que, en el sitio 1 (ambiente semirural) se determinó la mayor carga bacteriana promedio en ambos eventos de muestro (3012-3274 UFC m<sup>-3</sup>), siendo la de los sitios restantes similares entre sí. Las concentraciones de hongos oscilaron entre 71–229 UFC m<sup>-3</sup> en invierno y entre 424–2426 UFC m<sup>-3</sup> en primavera, mostrando un incremento significativo en esta última estación. El mayor promedio se correspondió al sitio 1(2065 UFC m<sup>-3</sup>). En el muestreo de primavera, la concentración en el sitio 2 (área urbana fue significativamente inferior), lo cual se podría asociar a la fuerte influencia que posee la flora en dicha estación en los demás sitios estudiados. De la comparación entre la carga de hongos y bacterias se observa que la última fue en casi todos los casos mayor, excepto en el sitio 4 durante el muestreo de primavera.

#### 3.2. Diversidad de poblaciones fúngicas.

Se determinaron un total de 18 géneros de hongos de los cuales el 88 % se correspondió a los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Geotrichum*. El grupo de las levaduras fue considerado como un conjunto y su aporte no superó el 2,5 % del total. En la Tabla 2 se presentan los géneros de hongos determinados y sus ocurrencias porcentuales en cada estación. En la Figura 3 se muestra la distribución de cada uno de los géneros en cada sitio de muestreo. En ella se advierte un marcado predominio de *Cladosporium* en la estación de primavera. Las diferencias de concentraciones observadas en las dos estaciones muestreadas son atribuidas a este último.

Tabla 2. Ocurrencia porcentual de géneros de hongos en ambos eventos de muestreo.

	Invierno 2005	Primavera 2005
<i>Epicoccum sp</i>	3	2
<i>Cladosporium sp</i>	16	89
<i>Alternaria sp</i>	38	6
<i>Geotrichum sp</i>	11	0
<i>Stemphyllum sp</i>	2	0
<i>Bipolaris sp</i>	1	0
<i>Sphaerulina sp</i>	0	< 1
<i>Curvularia sp</i>	0	< 1
<i>Penicillium sp</i>	15	1
<i>Aspergillus sp</i>	4	0
<i>Acremonium sp</i>	0	< 1
<i>Eurotium sp</i>	0	< 1
<i>Nigrospora sp</i>	< 1	< 1
<i>Trichotecium sp</i>	< 1	0
<i>Phoma sp</i>	< 1	0
<i>Fusarium sp</i>	1	< 1
<i>Boveria sp</i>	1	0
<i>Arthrinium sp</i>	3	0
Levaduras	5	0

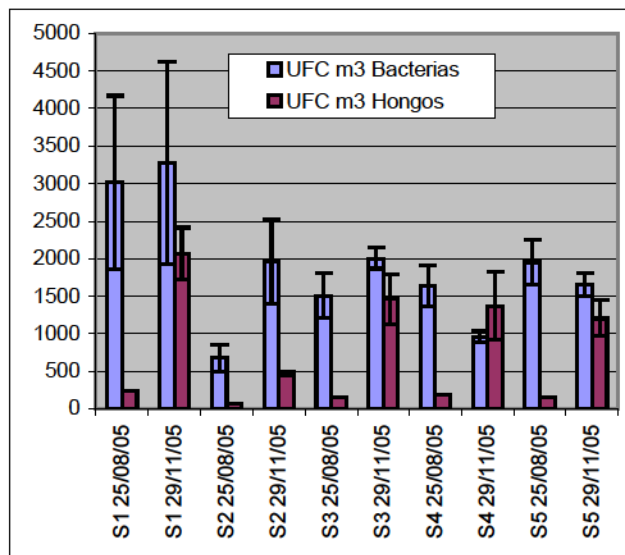


Figura 2. Distribución de las concentraciones microbianas en distintos sitios. S1-S5: Sitios 1 al 5.

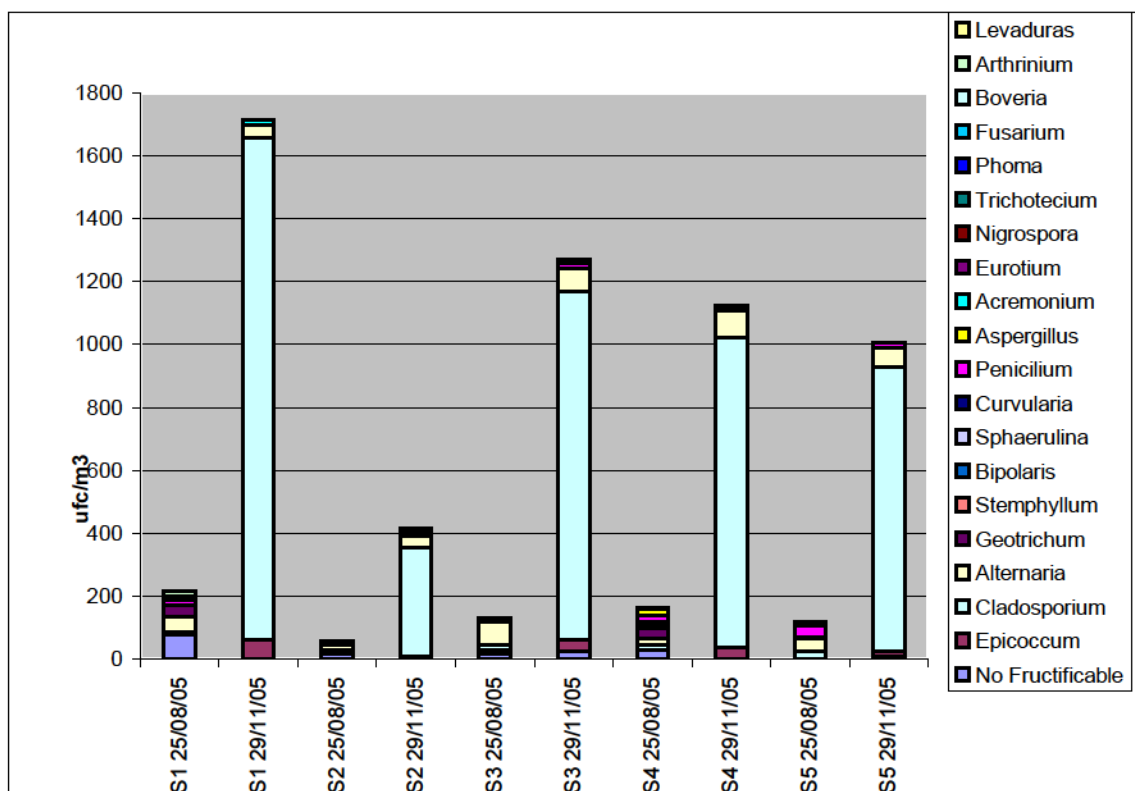


Figura 3. Distribución de las concentraciones de géneros de hongos por sitio (S1-S5= Sitios 1 al 5).

### 3.2. Estructura genética de las comunidades bacterianas.

En la Fig. 4 se observan los perfiles de bandas representativos de cada comunidad bacteriana en el muestreo invernal, realizándose dos réplicas por cada sitio. Del análisis visual del gel se puede inferir en función del número de bandas, que los perfiles obtenidos reflejan comunidades complejas; principalmente en el sitio 2 (área urbana), donde se observa una relativamente alta diversidad de especies. El dendrograma correspondiente muestra la formación de clusters por similitud entre comunidades, y se aprecia que existen similitudes entre comunidades bacterianas de diferentes sitios sin guardar relación entre réplicas. De lo que se infiere una diversidad de especies intra sitio de magnitud semejante a la obtenida entre los diferentes sitios muestreados.

La Fig. 5 muestra el perfil de comunidades representativas de los sitios estudiados en el muestreo de primavera. En esta oportunidad fue ampliado el número de réplicas a 4 por sitio, por lo que se obtuvieron 4 perfiles de bandas independientes. Del análisis visual del gel se aprecia que todos los sitios mostraron un número similar de bandas en cada perfil y distribuidas aproximadamente en una misma región del gradiente. En el dendrograma correspondiente se observa que el agrupamiento por similitud entre las comunidades no guarda relación entre réplicas. Sólo uno de los clusters formados incluye los cuatro perfiles representativos del sitio 3 (S3.1-S3.4 área industrial), junto con un perfil del sitio 1 (S1.3), uno del sitio 2 (S2.1) y otro del sitio 4 (S4.2). En este contexto, podría inferirse que factores externos propios del sitio ejercen cierta selección en la comunidad confiriéndole un grado de estabilidad espacial y temporal tal que es posible diferenciarla de las tomadas en los otros sitios estudiados.

De la comparación de ambos eventos de muestreo de la totalidad de sitios podría asumirse que las comunidades bacterianas viables en el periodo de primavera mostraron relativamente menor diversidad de especies que en el periodo de invierno. Particularmente en el sitio 2, la mayor diversidad de especies determinada en el muestreo invernal se redujo a valores semejantes a los determinados en los demás sitios en el muestreo de primavera.



Figura 4. Dendrograma de similitud de las comunidades bacterianas para dos réplicas de cada sitio del muestreo de Invierno. (S1.1= Sitio 1, réplica 1)

Jaccard (Opt:0.52%) (Tol 1.1%-1.1%) (H=0.0% S>=0.0%) [0.0%-100.0%]  
 29-11-05 S1-5 29-11-05 S1-5

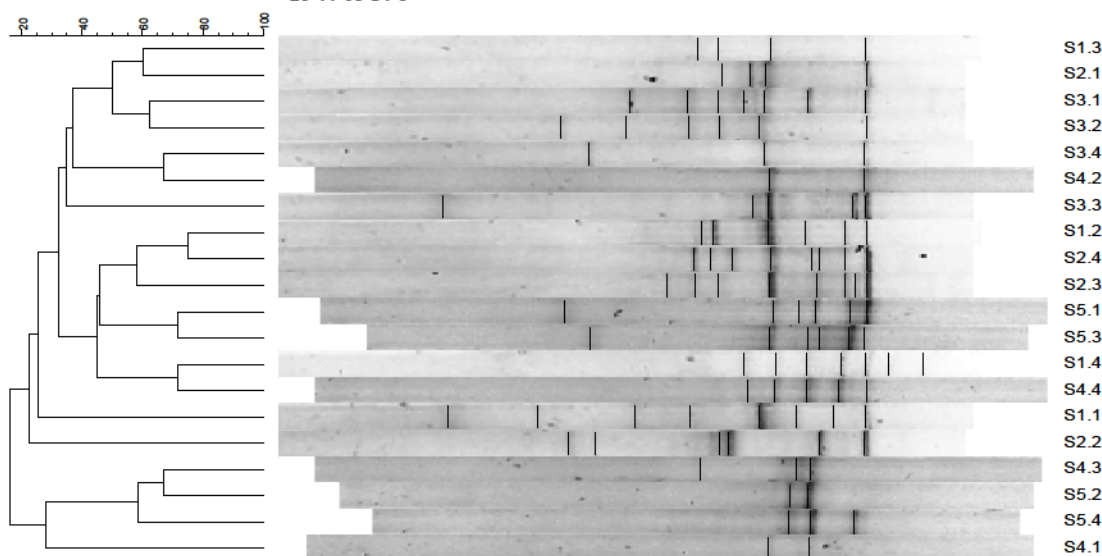


Figura 5. Dendrograma de similitud de comunidades bacterianas para cuatro réplicas de cada sitio durante el muestreo de primavera.

Los resultados obtenidos constituyen la primer contribución en la zona vinculada a la caracterización de bioaerosoles. Estudios previos realizados por investigadores del grupo de trabajo permitieron caracterizar partículas de polvo, la distribución de su tamaño, los compuestos orgánicos semivolátiles asociados y sus efectos (geno)tóxicos, y la influencia que diversas fuentes de combustión (urbano-industriales), que junto al enfoque aquí desarrollado, permitirá contar con un diagnóstico más acabado de la influencia que aerosoles de distinto origen determinan sobre la calidad de aire de la región (Müller et al, 2001; Massolo et al, 2002; Rehwagen et al, 2005).

#### Referencias bibliográficas:

- Adhikari, A; Sen, M.M; Gupta-Bhattaacharya, S.; Chnada, S. Airborne viable, non-viable, and allergenic fungi in a rural agricultural area of India: a 2 year study at five outdoor sampling stations. *Science of the Total Environment* 326, 123-141, 2004.
- Bauer, T.M; Ofner, E.; Just, H; Daschner, F.D. An epidemiological study assessing the relative importance of airborne direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 4, 301-309, 1990.
- Dutkiewicz J; Kryszynska-Traczyk, E; Skórska, C; Sitkowska, J; Prazmo, Z; Golec, M. Exposure to airborne microorganisms and endotoxin in herb processing plants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 8, 201-211, 2001.
- Henningson E.W; Ahlberg M.S. Evaluation of microbiological aerosol samplers: a review. *J. Aerosol Sci.*, Vol. 25, 1459-1492, 1994.
- Jones, A.M; Harrison, R.M. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations-a review. *Sci. of the Total Environment* 326, 151-180, 2004.
- Jones, B.L; Cookson, J.T. Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied & Environmental Microbiology*, March, 919-934, 1983.
- Kuske, C.R; Barns, S.M. y Busch, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3614-3621, 1997.
- Massolo L, Mueller A, Tueros M, Rehwagen M, Frank U, Ronco A and Herbarth, O. Assessment of Mutagenicity and Toxicity of Different size fractions of Air Particulates from La Plata, Argentina, and Leipzig, Germany, *Environmental Toxicology*, 17:219-231, 2002.
- Müller, A.; Alzuet, P; Herbarth, O; Ronco, A.E., Assessment of toxicity and mutagenicity in air particulate matter from an urban industrial area in the coast of the Rio de la Plata. *Environmental Toxicology*, 16, 151-157, 2001.
- Muyzer, G; De Waal, E; uitterlinden,A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. *Applied & Environmental Microbiology*, March, 695-700, 1993.
- Muyzer, G; Brinkhoff, T; Nübel, U; Santegoedes, C; Schäfer, H y Wawer, C. Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) in microbial ecology In: *Molecular Microbial Ecology Manual*

(Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. y de Bruijn, F. Eds.), 1-27, 1998. Kluwer Academic Press, Dordrecht.

- Rehwagen M, A Müller, L Massolo, O Herbarth<sup>1</sup>, A Ronco. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Science of the Total Environment*, 348:199-210, 2005.
  - Sokal, R.R. y Michener C.D.. A statistical method for evaluating systematics relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 3, 1409-1438, 1958.
  - Thorne, P.S; Kiekhaefer, M.S; Whitten, P; Donham, K.J. Comparison of bioaerosol sampling methods n barns housing swine. *Applied & Environmental Microbiology*, Aug, 2543-2551, 1992.
  - Wan-kuen Jo; Young-Jun Seo. Indoor and outdoor levels at recreation facilities, elementary schools, and homes. *Chemosphere* 61,p. 1570-1579, 2005.
-