

Caracterización de bacterias con actividad proteolítica aisladas de muestras de merluza (*Merluccius hubbsi*)

Estevao Belchior, S.¹; Pucci, O. H.²

1- Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

2- Centro de Estudios e Investigaciones en Microbiología Aplicada (CEIMA), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Cátedra de Microbiología Clínica, Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Km. 4, Ruta Prov. N°1- (9000) Comodoro Rivadavia. Chubut - Argentina.

RESUMEN: Se analizaron las características metabólicas y fisiológicas de bacterias proteolíticas aisladas de muestras de tegumento y contenido intestinal de merluzas (*Merluccius hubbsi*), capturadas en el Golfo San Jorge (Chubut, Argentina). Las mismas se diferenciaron presuntivamente de acuerdo al género y a la capacidad de producir proteasas. En 86 cepas seleccionadas, predominaron los bacilos Gram negativos, psicrótrofos, aerobios no fermentadores (97%). El 93% requirieron NaCl para desarrollar, toleraron hasta 7,5% (p/v) de la sal y desarrollaron entre pH 5 y 9. Fue significativo el porcentaje de cepas con capacidad de sintetizar enzimas ADNasa, lipasas, lecitinasas, β -galactosidasa, β -glucosidasa y ureasa. La distribución de géneros fue semejante en los dos sistemas analizados (tegumento y contenido intestinal), destacándose los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. La actividad proteolítica extracelular fue propia de cada cepa, existiendo considerables variaciones dentro del mismo género. Las cepas de mayor actividad proteolítica fueron de origen entérico y se relacionaron con el género *Pseudomonas*.

Palabras claves: merluza, bacterias psicrótrofas, actividad proteolítica.

SUMMARY: Characterization and identification of protease-producing bacteria isolated from hake (*Merluccius hubbsi*). Estevao Belchior, S.¹; Pucci, O. H.². The aims of this study were to identify and to determine the capacity of extracellular protease production by strains isolated from tegument and intestinal tract of hake (*Merluccius hubbsi*), collected from the San Jorge Gulf (Patagonia, Argentina). Eighty-six strains were selected, classified at genus level and tested for proteolytic activity by the azocasein method on the cell-free supernatant of cultures. Strains were capable of growing between 0°C and 30°C, tolerated NaCl concentrations less than 7.5% (w/v), but did not grow in culture without sea water or NaCl. On the other hand, they tolerated a pH range of 6 to 10 (optimum 7.5 to 8.5). Cells were Gram-negative, rod-shaped bacteria, grown aerobically with oxidative metabolism and were able to produce a range of exoenzymes, including lipases, gelatinase, caseinase, urease, DNase, and lecithinase. *Pseudomonas* and *Flavobacterium* were the predominant genus in both tegument and gut samples. Strains from gut of hake showed the highest levels of proteolytic activity estimated by the activity measured by azocasein method.

Key words: hake, psychrotrophic, proteolytic activity.

* Correspondencia:

Dra. Silvia Estevao Belchior
Tel/Fax: 0297 - 4550339 int.26
e-mail: sbelchior@unpata.edu.ar

Nota

Este trabajo fue presentado parcialmente en el VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Rafaela, Santa Fé, Argentina. 13 al 16 de Mayo de 1999, y en el V Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos y VI Simposio Brasileiro de Microbiología de Alimentos, Aguas de Lindoia, Estado de San Pablo, Brasil. 22 al 26 de Noviembre de 1998.

Introducción

La merluza común (*Merluccius hubbsi*), es probablemente la fuente más significativa de pescado blanco de América del Sur y es la base de la industria pesquera argentina.

Merluccius hubbsi, habita desde las proximidades de Cabo Frío, en Brasil (22° L.S.) hasta el sur de Argentina (55° L.S.), en una profundidad media de 200 m (entre 50 y 500 m). Toleran un rango de temperaturas entre 3 y 18°C con un óptimo comprendido entre 5 y 10°C y valores de salinidad entre 3,25 y 3,42‰, el óptimo estaría por encima de 3,35‰ (1).

Presenta una biomasa importante de especies juveniles en el área del Golfo San Jorge, entre 45°S y 47°S (provincias de Chubut y Santa Cruz) (2,3,4).

La pesca de la merluza constituye uno de los recursos económicos principales y genuinos de nuestra región patagónica. En los últimos años la captura de esta especie alcanzó aproximadamente un promedio de cien mil toneladas por año (5).

La merluza, se considera uno de los principales alimentos proteicos (6) y como otros productos de mar, está sujeto a un rápido deterioro microbiano debido a los altos niveles de compuestos nitrogenados en sus músculos (7).

Posteriormente a la captura del pez, el músculo es invadido por bacterias autóctonas que colonizan piel, agallas e intestino. La invasión de los microorganismos trae como consecuencia la presencia de nuevos sistemas enzimáticos en dicho tejido, ocasionando la degradación de proteínas y alteración de las características organolépticas, siendo inevitable la disminución del aprovechamiento, la calidad y vida útil original del pescado. Durante este proceso, se destaca la actividad de bacterias proteolíticas psicrótrofas marinas (8, 9).

Este grupo de bacteria que desarrollan y sobreviven en ambientes fríos, son consideradas extremófilas y han adaptado y optimizado sus procesos metabólicos a las condiciones ambientales (10). Los antecedentes comunicados, indican que estas bacterias, son saprofitas en peces de aguas frías como la merluza y responsables de su deterioro posteriormente a la captura (7, 8, 9, 11).

El objetivo planteado fue determinar las características metabólicas y fisiológicas de cepas proteolíticas aisladas de muestras de merluza

(*Merluccius hubbsi*) y diferenciarlas presuntivamente de acuerdo al género y a la capacidad de producir exoproteasas.

Materiales y métodos

Recolección y traslado de pescados

Se analizaron 23 especímenes pertenecientes a tallas juveniles de la especie *Merluccius hubbsi*. Los mismos fueron capturados en aguas del Golfo San Jorge (45° S y 47° S), en una embarcación costera con redes de arrastre de fondo y a una distancia entre 8 y 30 millas marinas desde el puerto de Comodoro Rivadavia. La temperatura del agua de mar en esa zona varía entre 5 y 15°C y la salinidad es normalmente 3,5‰ (p/v).

Las merluzas fueron recogidas vivas, en forma individual mediante bolsas de polietileno tomadas a modo de guante y transportadas al puerto de Comodoro Rivadavia, Escalante, Chubut, en heladera portátil, con hielo. Las mismas fueron procesadas dentro de las 20 horas de haber sido capturadas.

Obtención y procesamiento de muestras

Solamente se procesaron los pescados sin aplastamientos ni cortes y con tractos alimenticios intactos y en buen estado. Se obtuvieron muestras de tegumento y contenido intestinal.

Las muestras de tegumento fueron obtenidas por deslizamiento y rotación de un hisopo de algodón estéril sobre una superficie del pescado de 100 cm². A continuación, el hisopo, se transfirió a 10 ml de solución diluyente (agua de mar estéril con 1% de peptona de caseína). Las muestras se homogeneizaron mediante vortex durante 1 minuto y se realizaron diluciones decimales, sucesivas y en número apropiado, en agua de mar estéril (11, 12).

Después de lavar y desinfectar con alcohol al 70% la piel de cada pescado, fueron disecados asépticamente. La porción media del tracto intestinal fue removida. Se aspiraron 100 ml de contenido intestinal que se transfirieron a 10 ml de la misma solución diluyente, luego se homogeneizó mediante vortex por 1 minuto. Se dejó decantar el material particulado y se realizaron diluciones decimales seriadas del sobrenadante en agua de mar estéril (13).

Aislamiento de bacterias proteolíticas

Se empleó la técnica de diseminación en superficie sobre placas de agar ZoBell suplementado con leche, para aislar y diferenciar cepas con actividad proteolítica. El medio ZoBell, (g/100 ml: peptona de carne 0,5; extracto de levadura 0,1; agua de mar filtrada 75 ml; agua destilada 25 ml - pH 7,5) (12), previamente esterilizado, fue suplementado con 10 ml de una solución de leche descremada (10% p/v) estéril (agar ZoBell-leche). Las placas se incubaron a 4°C hasta 15 días.

Las colonias de bacterias con actividad proteolítica, se diferenciaron por la presencia de un halo transparente de proteólisis alrededor. Luego de registrar el aspecto macroscópico de las mismas, se replicaron en cultivo puro en agar ZoBell.

Características morfológicas y de crecimiento

La morfología bacteriana fue analizada mediante la coloración de Gram y además se determinaron las características fisiológicas de cada cepa seleccionada, según su crecimiento bajo las siguientes condiciones:

- **Tolerancia a distintas temperaturas:** Se determinó el rango de temperaturas de desarrollo en agar ZoBell-leche a 0, 7, 22, 30, 35, 42 y 50 °C.

- **Tolerancia a las concentraciones de cloruro de sodio:** Se inocularon cultivos puros de las cepas en caldo ZoBell con: 0; 1,5; 2; 3; 5; 7; 9; 12 y 15% de NaCl.

- **Tolerancia a distintos pH:** Se inocularon cultivos puros de las cepas en caldo ZoBell a pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12.

- **Tolerancia al oxígeno:** Se observó desarrollo bacteriano en aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis, utilizando para ello caldo tioglicolato con 2% de NaCl.

- **Obtención de energía:** Se inocularon por punción medios OF (según Hugh y Leiffson) para determinar si los microorganismos oxidan o fermentan la glucosa.

Características metabólicas

Las cepas fueron analizadas con el fin de determinar sus características metabólicas y lograr una identificación presuntiva al nivel de género.

Descripción de las reacciones: Se efectuaron pruebas de: crecimiento en agar Mac Conkey; pro-

ducción de pigmento; reducción de nitratos a nitritos o a gas nitrógeno; movilidad; producción de citocromo oxidasa y catalasa; producción de arginina dihidrolasa (A.D.H.), lisina descarboxilasa (L.D.C.), ornitina descarboxilasa (O.D.C.); β -galactosidasa (O.N.P.G.) y ureasa; hidrólisis de esculina (β glucosidasa); hidrólisis de gelatina (proteasa); asimilación de los siguientes sustratos: glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina (NAG), maltosa, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato, fenilacetato y fructosa; producción de sulfhídrico a partir de tiosulfato sódico; producción de triptofano deaminasa (T.D.A.) y producción de indol a partir de triptofano; producción de acetoina; oxidación/fermentación de los siguientes sustratos: glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa.

Otras características estudiadas fueron: sensibilidad al agente vibriostático O/129 (2-4 di NH₂, 6-7-di isopropil pteridina - 150 mg), a polimixina B (50 U) y penicilina (10 U); producción de ADNasa; producción de lecitinasa; hidrólisis de Tween 80; hemólisis y desarrollo en agar tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa (T.C.B.S.).

Los ensayos de caracterización metabólica de las cepas, se efectuaron siguiendo metodologías estándar (14), siendo modificados los medios de cultivo por la adición de NaCl en una concentración del 2% (p/v).

Las pruebas de identificación se incubaron a temperatura ambiente, registrando los resultados a las 24 y 48 horas.

Análisis de agrupamiento

Con la finalidad de establecer similitudes entre las cepas analizadas a lo largo del estudio, se llevó a cabo el análisis de agrupamiento sobre la base de las características metabólicas.

Estos análisis fueron efectuados mediante el programa NTSYS (15), utilizando el coeficiente Simple Matching para la confección de las matrices de similitud y el ligamiento promedio para la construcción de los fenogramas.

La ejecución de esta técnica consta de los siguientes pasos: elección de las unidades taxonómicas operativas (otus); elección de los caracteres; confección de la matriz básica de datos (m.b.d.); matriz de similitud o matriz de distancia, según como sea

confeccionada la matriz de similitud, se seguirá el modo Q (similitud de bacterias) o R (similitud entre reacciones); construcción del fenograma; construcción de matriz cofenética; obtención del coeficiente de correlación cofenética y consenso entre varias clasificaciones.

Identificación de géneros

Las cepas se clasificaron presuntivamente al nivel de género considerando: (*) el esquema propuesto por Oliver (16), para identificación de bacterias marinas que separa los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Lucibacterium*, *Xanthomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Photobacterium*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Moraxella*, *Flexibacter*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Caulobacter* y familia Enterobacteriaceae; (**) criterios de diferenciación bioquímica entre géneros propuestos en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (17).

Producción de proteasas a distintas temperaturas

Las cepas aisladas se sembraron en medio ZoBell-leche y en medio gelatina nutritiva adicionado con 2% de NaCl a 0, 7, 22, 30, 35, 42 y 50 °C. Se registraron los datos de proteólisis a las temperaturas testeadas.

Se consideró la hidrólisis positiva cuando: en el agar con leche se evidenció un halo transparente alrededor de la colonia y en el medio con gelatina se produjo licuefacción del mismo, permaneciendo en ese estado a temperaturas de solidificación de la gelatina.

Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica en el sobrenadante del cultivo libre de células se determinó utilizando azocaseína como sustrato de acuerdo a la técnica descrita por Margesin and Shinner (18). Para la mezcla de reacción se empleó buffer fosfato 67 mM - pH 7 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los resultados se expresaron como Unidad de Digestión de Azocaseína (U) por ml de sobrenadante (U/ml). Una (U) se consideró igual al aumento de absorbancia de 0,001 por minuto a 340 nm, en las condiciones descritas. Cada ensayo fue realizado por triplicado y promediado.

Resultados y discusión

Aislamiento de bacterias psicrótrofas con actividad proteolítica

Se analizaron 46 muestras, 23 de tegumento y 23 de contenido intestinal, obtenidas de especímenes de merluza capturados en Golfo San Jorge (Chubut, Argentina),

De las suspensiones de hisopados de tegumento y contenidos intestinales se realizaron aislamientos en agar ZoBell-leche. Posteriormente cada suspensión se conservó a 0°C, repitiéndose los cultivos en agar a los 7 y 30 días, con la finalidad de seleccionar cepas proteolíticas para su caracterización.

Se seleccionaron 86 colonias, 36 provenientes de aislamientos intestinales y 50 de tegumento. Las cepas fueron nombradas mediante números consecutivos cada uno seguido de letras mayúsculas A, B y E, que corresponden, respectivamente, al tiempo en que fue aislada la cepa ya sea: de la muestra recién procesada, a los 7 días o a los 30 días de conservación a 0°C. Con las letras en minúscula t o i se indicó su procedencia (t: tegumento, i: intestino).

Caracterización morfológica y fisiológica

En general, las colonias seleccionadas se caracterizaron por ser lisas brillantes elevadas circulares y cremosas. Algunas colonias desarrollaron pigmento de color amarillo o anaranjado. Esta característica en la mayoría de las colonias se observó solamente en el primer aislamiento.

Utilizando la coloración de Gram, se observó la presencia de bacilos rectos o curvos Gram negativos. No se aislaron microorganismos Gram positivos de ninguna de las fuentes analizadas.

Las colonias se visualizaron entre 5 y 7 días de incubación a bajas temperaturas (0-4 °C), en cambio a temperatura ambiente demoraron entre 24 y 48 horas. Por este motivo las pruebas metabólicas se incubaron a esta última temperatura.

La mayor proporción (92%) de la población estudiada desarrolló en un rango entre 0 y 30 °C, por lo tanto se podrían clasificar como bacterias psicrótrofas de acuerdo a la definición de Morita (10). El resto de las cepas desarrollaron entre 0 y 20 °C (figura 1.a.).

Las bacterias psicrótrofas constituyen un grupo térmico autóctono de peces que habitan en ambientes fríos. Formando parte de este grupo, se encuentran bacterias proteolíticas, principalmente, Gram negativas (7, 8, 11, 12, 19, 20). Muestran un desarrollo óptimo a 18 y 22 °C y pueden crecer de 0 a 25 °C. Tienen una tolerancia limitada a las altas temperaturas. Esta sensibilidad está asociada a la pérdida de actividad de enzimas y de sistemas enzimáticos respiratorios, uso acelerado del pool de amino ácidos, incremento en la saturación de lípidos de la membrana celular, pérdida de permeabilidad de la membrana celular, pérdida de componentes intracelulares (proteínas, DNA, RNA, aminoácidos libres, fosfolípidos) (10).

En relación a la tolerancia a distintas concentraciones de NaCl, los resultados se reflejan en la figura 1.b. Se observó que la mayoría de las cepas (93%) demostraron ser dependientes de la presencia de NaCl en el medio, para desarrollar.

Si bien la concentración salina del agua en el Golfo San Jorge es normalmente 3,5‰, el 98% de las cepas toleró 7,5‰ (p/v) de la sal.

Estas características se corresponden con el grupo de bacterias marinas debido a que, las cepas en estudio, desarrollaron únicamente en presencia de la sal y no soportaron concentraciones superiores a 7,5‰ (21).

Las bacterias marinas tienen requerimientos fisiológicos de sodio y presentan una adaptación obligada a la salinidad de los océanos. En condiciones de falta de NaCl las células se lisan (10).

Cuando se evaluó el rango de crecimiento a distintos pH, los microorganismos estudiados desarrollaron entre pH 5 y 9. Este resultado podría ser atribuido a la habilidad de las cepas para adaptarse a diferentes condiciones ambientales de pH (22).

Caracterización metabólica

La tabla 1 muestra la distribución de características metabólicas de los aislamientos de las diferentes muestras.

El 3% de las cepas fermentaron la glucosa por la vía ácido mixta y estas produjeron indol a partir de triptofano, utilizaron citrato como única fuente de carbono y la vía arginina dihidrolasa para obtener energía. Estos microorganismos anaerobios facultativos, fueron caracterizados como *Vibrio* sp. basándose en

las pruebas de identificación, la sensibilidad al O/129 y desarrollo en agar T.C.B.S. Además, se evaluaron bioquímicamente para diferenciarlos en especies. Para ello se consideraron los resultados de las pruebas de fermentación y utilización de azúcares; rojo de metilo; Voges-Proskauer; reducción de nitratos; producción de indol; hidrólisis de urea; producción de L.D.C., O.D.C. y A.D.H., lipasa, gelatinasa, amilasa y DNAs; pruebas de halofiliismo; desarrollo a distintas temperaturas y producción de pigmentos. De acuerdo a los resultados obtenidos no se estableció ninguna relación con las especies de *Vibrio* descritas en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (17). Por ese motivo, estas cepas fueron clasificadas presuntivamente como *Vibrio* sp.

Las cepas restantes (no fermentadoras) fueron incapaces de crecer en condiciones de anaerobiosis y un bajo porcentaje de cepas redujeron nitratos (7%). Únicamente, el 22% oxidó la glucosa y en general no oxidaron otros hidratos de carbono a excepción de: manitol (48%), sacarosa (41%) y melibiosa (16%).

El 31% de las cepas produjeron pigmentos, predominando el amarillo y anaranjado, se encontró mayor porcentaje de bacterias pigmentadas en tegumento que en intestino.

Un importante porcentaje de cepas asimilaron glucosa (77%), fructosa (56%), gluconato (45%) y malato (44%).

Así mismo, fue significativa la capacidad de sintetizar ADNasa (95%), lipasas (72%), lecitinasas (58%), β -galactosidasa (37%), β -glucosidasa (65%) y ureasa (30%). Todos los microorganismos hidrolizaron caseína y gelatina en el rango de temperatura de crecimiento bacteriano (0 a 30°C).

Las cepas estudiadas fueron negativas para las siguientes reacciones: descarboxilación de los aminoácidos lisina, ornitina; desaminación de triptofano, producción de SH_2 , asimilación de arabinosa, manosa, caprato, adipato, fenilacetato y N-acetil glucosamina, producción de ácido a partir de inositol, sorbitol, ramnosa, amigdalina y arabinosa.

Análisis de agrupamiento

Con los resultados obtenidos en la caracterización de las cepas seleccionadas se realizó una matriz de datos con 86 cepas y 58 reacciones metabólico-fisiológicas. El resultado positivo de cada

reacción se codificó con 1, al negativo con 0 y las reacciones dudosas con 9.

El análisis de agrupamiento en modo R, consistió en el agrupamiento de las 58 reacciones metabólico-fisiológicas (figura 2). El mismo conformó 4 núcleos (a,b,c,d) que demuestran las igualdades de las cepas (nivel de similitud 0) para las características metabólicas y fisiológicas efectuadas. El núcleo c, indicó que el comportamiento de las cepas fue homogéneo frente a concentraciones salinas de 12 y 15% (p/v), ambas fueron inhibitorias para el desarrollo de las bacterias estudiadas. En el núcleo d se confirmó que todas las cepas presentaron una conducta igual frente a las siguientes condiciones de crecimiento: concentraciones de 1,5; 3 y 4,5% de NaCl, temperaturas de crecimiento de 0, 4 y 20°C e hidrólisis de gelatina. Este núcleo fue congruente con las características de las bacterias psicrotrófas marinas proteolíticas, objeto de este estudio.

Los otros núcleos (a y b) están formados por reacciones que son negativas en toda la población bacteriana estudiada y que no tienen un patrón de explicación como en las reacciones anteriores.

El elevado número de reacciones compartidas, tanto positivas como negativas, demostró que los microorganismos analizados son semejantes metabólicamente y fisiológicamente. Este resultado se corrobora con el análisis de agrupamiento de las bacterias (modo Q).

El análisis de agrupamiento en modo Q agrupó a las bacterias de acuerdo a su comportamiento frente a las pruebas practicadas.

Se realizó una matriz de similitud, en la que se excluyeron los otus iguales y las reacciones compartidas (producción de indol; hidrólisis de gelatina; ADH; LDC; ODC; TDA; Voges Proskauer; crecimiento a 0, 4, 20 y 45 °C; tolerancia a 3; 4,5, y 15% de NaCl; asimilación de: xilosa, arabinosa, manosa, caprato, citrato, fenilacetato; ácido de: arabinosa, amygdalina, ramnosa, sorbitol, inositol), con el fin de eliminar la distorsión que provocan el elevado número de reacciones compartidas.

De la nueva matriz, surgió el fenograma representado en la figura 3, donde se observó una relación entre las bacterias, que no está influenciada por la repetición de caracteres con igual valor. En el se

formaron 4 agrupamientos y una bacteria aislada representante del grupo de cepas fermentadoras.

Los 4 agrupamientos tienen como característica en común que se integraron por bacterias de intestino y tegumento obtenidas en diferentes etapas del enriquecimiento a 0 °C.

En este análisis no se registraron diferencias significativas entre la población de tegumento e intestino, similares resultados obtuvieron otros autores (12, 16).

Además, se observó que el enriquecimiento a temperaturas de 0 °C durante 30 días no seleccionó cepas diferentes de las que se encontraron como cepas mayoritarias en la población inicial.

Si bien el número de reacciones finales, empleadas en este análisis de agrupamiento, no fue muy grande se evidenció una notable diversidad metabólica entre las cepas.

Identificación presuntiva de géneros

La caracterización, en géneros y especies, de bacterias marinas fue dificultosa. Las pruebas bioquímicas y fisiológicas deberían complementarse con la información que proveen los métodos moleculares que se utilizan en el análisis filogenético de las poblaciones (23, 24).

Si bien existen algunos esquemas taxonómicos para identificar bacterias marinas (16), el actual conocimiento de nuevos géneros y especies existentes en este ambiente, no permite asegurar la confiabilidad de los resultados (17, 25, 26, 27).

La distribución de géneros, también, fue semejante en los dos sistemas analizados, ambos difirieron en la presencia del género *Vibrio*, identificado solamente en las muestras de contenido intestinal.

En la tabla 2 se muestra la distribución y los porcentajes de abundancia genérica en los aislamientos originales (tiempo cero) para cada tipo de muestra.

En ambas poblaciones proteolíticas se identificó una escasa variedad genérica. Este resultado, sería propio de un biotopo extremo donde pocos géneros están presentes y solamente se seleccionan aquellos microorganismos que pueden enfrentarse con los factores de stress ecológico (bajas temperaturas, bajos pH, la acción de enzimas digestivas, la acción de ácidos biliares, condiciones anaeróbicas, movimientos peristálticos, etc).

Los géneros que se caracterizaron de manera presuntiva, ya fueron recuperados como miembros de distintos nichos marinos por otros investigadores y se especializan en la degradación de macromoléculas muy complejas (12, 24, 28, 29).

El género *Pseudomonas*, se relaciona normalmente con la microflora de merluza y otros peces, y fue reconocido entre los microorganismos responsables del deterioro de distintos alimentos, inclusive pescado y sus derivados (6, 8, 12, 19, 30, 31, 32). La dominancia del género *Pseudomonas*, entre los psicrótrofos proteolíticos de distintos ecosistemas, puede ser atribuida a su buena habilidad de adaptación frente a modificaciones ambientales, a la capacidad de multiplicarse con tiempos de generación menores que otros microorganismos a bajas temperaturas y a la mayor competencia para atacar diversas sustancias orgánicas (8, 31, 33).

El género *Flavobacterium* es extremadamente heterogéneo, se encuentra constituido por microorganismos de vida libre que habitan tanto en ambientes terrestres como marinos. Incluye especies Gram negativas productoras de pigmento amarillo, que pueden oxidar carbohidratos, móviles por medio de flagelos peritricos o inmóviles. Presentan la habilidad de degradar polisacáridos y contribuir al catabolismo aeróbico de material orgánico (29, 34).

Tanto *Pseudomonas* como *Flavobacterium* han sido aislados en estudios previos en merluza de pacífico (*Merluccius productus*) y de la zona común de pesca Argentino-Uruguaya (*Merluccius hubbsi*) (6, 35).

Si bien se recuperaron bajos porcentajes de bacterias Gram negativas fermentadoras (*Vibrio* sp.) con capacidad para hidrolizar proteínas, se ha comunicado que, por lo general, forman parte de la población comensal del tracto alimenticio de los peces marinos (35).

Las especies marinas que forman parte del género *Alteromonas* son bacilos Gram negativos aerobios, pigmentados o no, con flagelo polar que se diferencian del género *Pseudomonas* por el bajo contenido en G+C. Recientemente por medio de análisis filogenéticos de secuencias de 16S rDNA el género fue dividido en *Alteromonas* y un nuevo género denominado *Pseudoalteromonas* (26, 27, 36).

En la figura 4 se representó la distribución de géneros durante el enriquecimiento a 0°C. A lo largo

de la experiencia se identificaron, presuntivamente, cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* y el grupo constituido por *Pseudomonas/Alteromonas*, ambos predominaron en la última etapa (30 días a 0°C). Similares resultados fueron obtenidos por Lee y Harrison (6) durante la conservación de merluza del pacífico a temperaturas de refrigeración 5°C durante 14 días, como así también en estudios de deterioro de otros teleosteos como perca y lenguado (8). Los microorganismos fermentadores se recuperaron solamente en muestras frescas de contenido intestinal y la presencia de *Flavobacterium* disminuyó al final de la conservación de las muestras.

Producción de proteasas

Debido a que en ocasiones las zonas de transparencias que se producen en el agar leche pueden deberse también a la solubilización de la caseína como resultado de la acidulación del medio (38), se cuantificó la actividad proteolítica de cada cepa mediante el método de azocaseína (33).

La actividad proteolítica de cada cepa bacteriana se determinó cuantitativamente a partir del cultivo en un medio base mineral adicionado con peptona de caseína (34). Los cultivos fueron incubados por 48 horas, a temperatura ambiente con agitación continua y se obtuvieron sobrenadantes libres de células para realizar las determinaciones.

Basándose en los resultados de las unidades de actividad proteolítica obtenidas, bajo las condiciones del ensayo, las cepas se dividieron en 3 clases: los aislamientos con una actividad entre 0 y 40 U/ml fueron designados con baja actividad proteolítica (57%), aquellas cepas con actividad entre 40 y 70 U/ml fueron consideradas moderadamente proteolíticas (17%) y las que presentaron una actividad mayor de 70 U/ml fueron consideradas con alta actividad proteolítica (26%) (37) (figura 5).

Se observó que la actividad proteolítica extracelular es propia de cada cepa, existiendo considerables variaciones dentro del mismo género.

Cabe resaltar que, de las cepas de mayor actividad proteolítica el 66% fueron de origen entérico y el 55% se relacionaron con el género *Pseudomonas* ó con el grupo *Pseudomonas/Alteromonas*.

La descripción de las especies microbianas con actividad proteolítica asociadas a la estructura externa y contenido intestinal de merluza, aporta co-

nocimientos potencialmente aplicables a la optimización en los métodos de conservación de la merluza y contribuye a completar la información existente sobre taxonomía y ecología de bacterias marinas de diferentes ecosistemas del mar argentino (12, 35, 39, 40, 41, 42, 43)

Conclusiones

Las bacterias con actividad proteolítica constituyeron un componente común dentro de la biocenosis bacteriana del tegumento e intestino de las merluzas analizadas.

La población de bacterias proteolíticas en ambas muestras se caracterizó por un amplio predominio de bacilos Gram negativos, aerobios, con meta-

bolismo estrictamente respiratorio. Estos microorganismos se caracterizaron por utilizar una escasa variedad de carbohidratos como fuentes de carbono y energía. Presentaron requerimiento obligado de cloruro de sodio para desarrollar. Desarrollaron en el rango de los microorganismos psicrótrofos y el crecimiento más rápido se registró a temperatura ambiente. Presentaron gran versatilidad para multiplicarse tanto a valores de pH levemente ácidos como alcalinos. Además, dentro de la población, se destacaron los microorganismos con un amplio potencial hidrolítico de macromoléculas como DNA y lípidos.

La producción de enzimas proteolíticas fue muy variable entre las cepas estudiadas, encontrándose en el hábitat intestinal, los microorganismos que manifestaron los mayores niveles de actividad.

Tabla 1: Distribución de características fenotípicas de las cepas (%) de acuerdo a su origen.

Reacciones	Intestino (n:36)	Tegumento (n:50)	Reacciones	Intestino (n:36)	Tegumento (n:50)
Red. Nitrato	8	6	As. citrato	8	0
Indol	8	0	As. fructosa	47	62
Fer. glucosa	8	0	Oxidasa	94	100
Sens. O/129	8	0	ADNasa	97	94
ADH	8	0	Lecitinasa	58	58
Urea	36	26	Movilidad	39	44
Esculina	53	74	Lipasa	80	53
Gelatina	100	100	Pigmentos	22	38
ONPG	36	38	Ác. glucosa	8	10
As. glucosa	61	88	Ác. manitol	42	52
As. manitol	0	26	Ác. sacarosa	47	36
As. maltosa	14	26	Ác. melibiosa	17	16
As. gluconato	39	50	Hemólisis	17	14
As. Malato	42	46	*McConkey	86	80

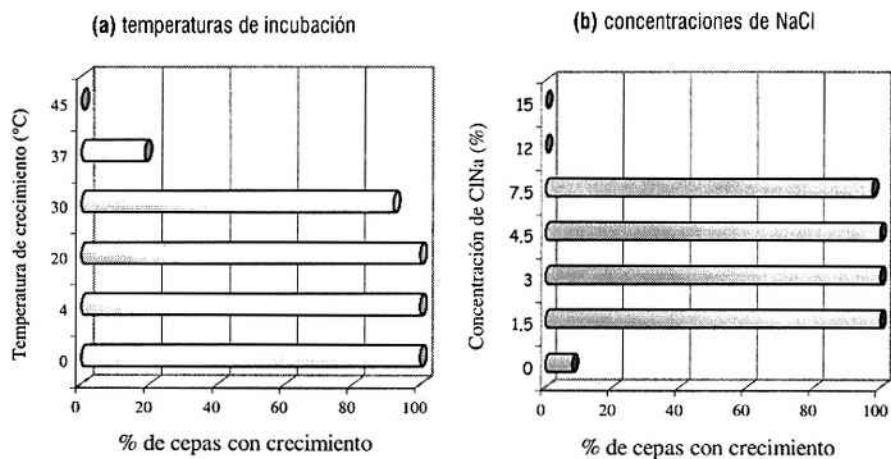
Red: reducción, Fer: fermentación, Sens.: sensibilidad, ADH: Arginina dihidrolasa, As.: asimilación, Ác.: ácido;

* la prueba se refiere a presencia de desarrollo en agar McConkey; los datos se expresaron en % de cepas con reacción positiva.

Tabla 2: Distribución de géneros (%) en aislamientos originales

Géneros	Total (n: 43)	Intestino (n:20)	Tegumento (n:23)
<i>Flavobacterium</i> sp.	21	15	26
<i>Pseudomonas</i> sp.	44	55	35
Grupo <i>Pseudomonas/Alteromonas</i> ^a	28	15	39
<i>Vibrio</i> sp.	7	15	...

^a) En este grupo se encuentran cepas de características similares con ambos géneros

Figura 1: Tolerancia a distintas condiciones de crecimiento bacteriano

Datos expresados en % de cepas que desarrollaron, número total: 86 cepas

Figura 3: Fenograma , análisis de agrupamiento en modo Q,

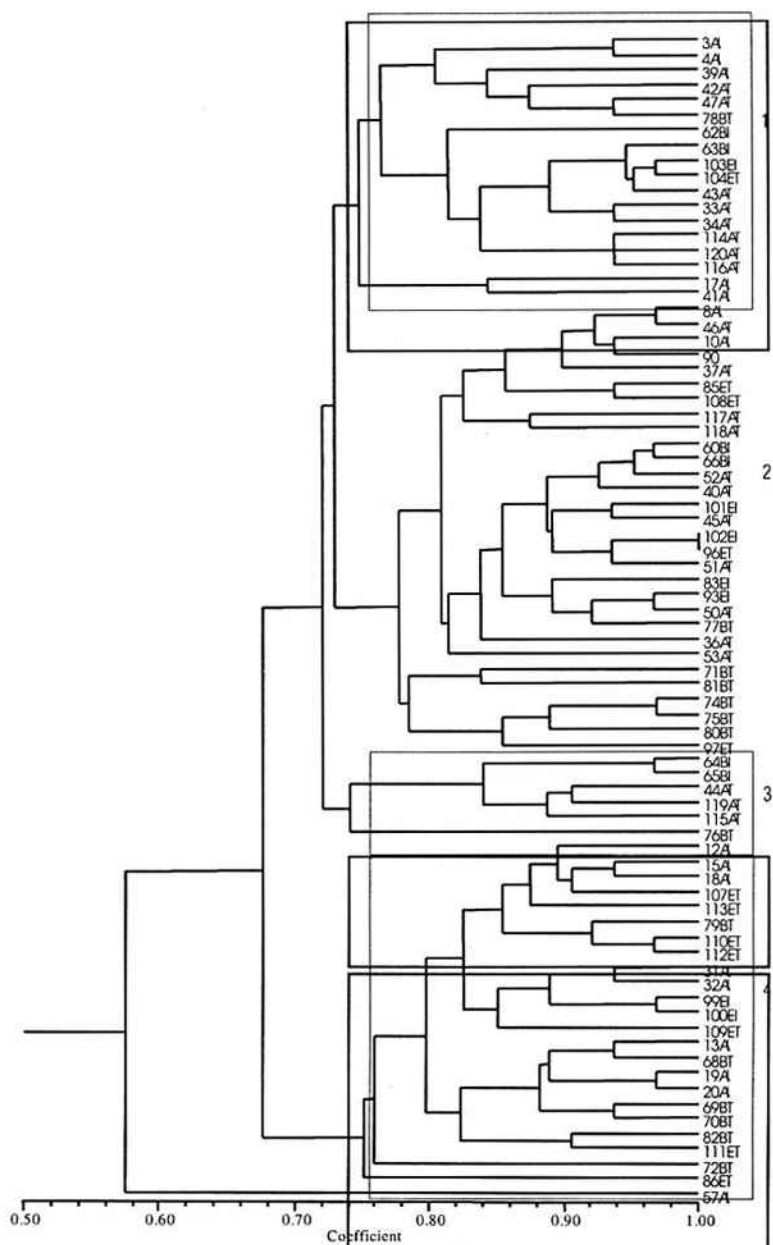
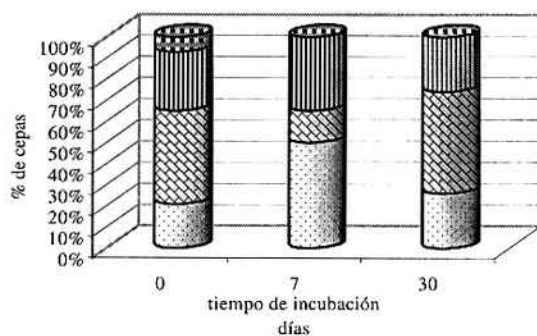


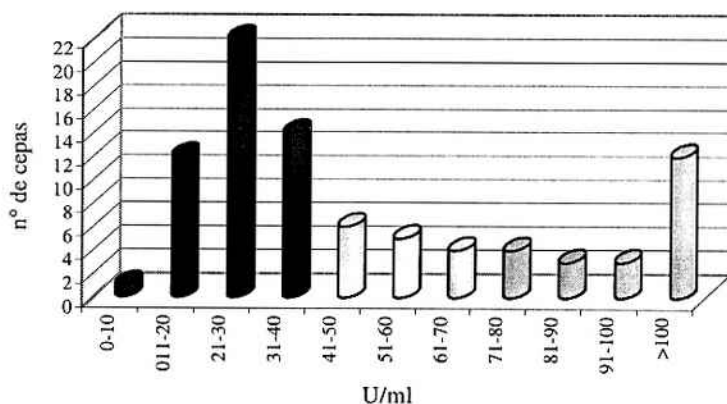
Figura 4: Distribución de géneros (%) de acuerdo a la etapa de aislamiento



- Flavobacterium*
 Pseudomonas
 Pseudomonas/Alteromonas
 Vibrios

Número de cepas a diferentes tiempos de conservación a 0°C: tiempo 0 :43 cepas; a 7 días: 20 cepas y a 30 días: 23 cepas.

Figura 5: Distribución de cepas de acuerdo a la actividad proteolítica



- Actividad proteolítica baja
 Actividad proteolítica moderada
 Actividad proteolítica alta

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Luis Badía por la captura y traslado de las merluzas.

Bibliografía

- Cousseau M.B. & R.G. Perrotta. 2000. Peces Marinos de Argentina. Biología, distribución y pesca. INIDEP, (Mar del Plata, Argentina) : 167.
- Bambill G, M. Perez, M. Renzi, C. Dato, O. Wholer, G. Cañete, S. Bezzi. 1996. Evaluación de merluza (*Merluccius hubbsi*) en la plataforma Argentina, entre 34°S y 48°S, en agosto y septiembre de 1993. INIDEP Inf. Tec., 7:21-68.
- Bezzi S. y C. Dato. 1995. Conocimiento biológico pesquero del recurso merluza (*Merluccius hubbsi*) y su pesquería en la República Argentina. INIDEP Doc. Cientif., 4:3-52.
- Premski LB y V. Angelescu. 1993. Ecología trófica de la merluza común (*Merluccius hubbsi*) del Mar Argentino. Parte 3. INIDEP Doc Cientif., 1:1-118.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 2003. Dirección Nacional de Pesca y Acuicultura, <http://www.sagpya.mechon.gov.ar/pesca/estadist>.
- Lee J.S. and J. Harrison. 1968. Microbial flora of pacific hake (*Merluccius productus*). Appl. Microbiol., 16:1937-1938.
- Makarios-Laham I. and T-Ch. Lee. 1993. Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated and frozen seafood due to obligately psychrophilic bacteria. J. Food Sci., 58:310-313.
- Liston J.. 1980. Microbiology in fishery science. In: "Advances in fish science and technology". Edited by Connell J.J.. Torry Research Station, (Aberdeen, Scotland) : 138-157.
- Yeannes M.I. 1994. En curso: Preservas y control de calidad. Comodoro Rivadavia, Chubut , Argentina.
- Morita R. 1975. Psychrophilic Bacteria. Bacteriol. Rev., 39:144-167.
- Horsley R.W. 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. J. of Fish Biology., 10:529-553.
- Monticelli L. y M. Costagliola. 1989. Estudio bacteriológico de la merluza (*Merluccius hubbsi*) capturada en la zona común de pesca Argentino-Uruguayana y de su ambiente. Publ. Com. Téc. Mix. Fr. Mar., 5:87-94.
- Ruby E.G. and J.G. Morin. 1979. Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities and dispersion. Appl. Environ. Microbiol., 38:406-411.
- Smibert R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization. In: "Manual of methods for general bacteriology". Edited by Gerhardt P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips. American Society for Microbiology. (Washington D.C. U.S.A.) : 409-443.
- Rohif F.J.. 1989. "NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system" Exeter Publishing, Ltd. (New York).
- Oliver J. 1982. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria, Deep-sea Res., 29:795-798.
- Holt JS, Krieg NR, Sneath PHA, Williams ST. 1994. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", (9th ed), Williams and Wilkins Co., (Baltimore) : 39-289.
- Margesin R. and F. Schinner. 1991. Characterization of metalloprotease from psychrophilic *Xanthomonas maltophilia*. FEMS Microbiol. Lett., 79 : 257-262.
- Simmonds C.K. and E.C. Lamprecht. 1981. Correlation of microbiological status with organoleptic quality of chilled Cape hake. In: "Advances in fish science and technology". Edited by Connell J.J.. Torry Research Station, (Aberdeen, Scotland) : 297-299.
- Vasquez S.C., L.N. Rios Merino, W.P. MacCormack and E.R. Fraile. 1995. Protease-producing psychrotrophic bacteria isolated from Antarctica. Polar Biol., 15:131-135.
- Stainer R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, P.R. Painter. 1988. In: "Microbiología". Ed. Reverté S.A., (Barcelona, España) : 218-219.
- Dawes, C.J., 1981. Marine Bacteria. In "Marine Botany". Edited by Wiley J. & sons, Inc. (New York, U.S.A.), 587-607.
- Feller G, E. Narinx, J.L. Arpigny, M. Aittaleb, E. Baise, S. Genicot and Ch. Gerday. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. FEMS Microbiol. Rev., 18:189-202.
- Llobet-Brossa E., R. Rosselló-Mora and R. Amann. 1998. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 64:2691-2696.
- Gauthier M.J., B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin and J.C. Bertrand. 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 42:568-576.
- Holmström C., S. James, B. Neilan, D. White and S. Kjelleberg. 1998. *Pseudoalteromonas tunicata* sp nov., a bacterium that produces antifouling agents. Int. J. Syst. Bacteriol., 48:1205-1212.
- Sawabe T., H. Makino, M. Tatsumi, K. Nakano, K. Tajima, M. Mahbub Iqbal, I. Yumoto, Y. Ezura and R. Christen. 1998. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp nov., a marine bacterium that is the causative agent of red disease of *Laminaria japonica*. Int. J. Syst. Bacteriol., 48:769-774.
- Baskin S.. 2001. The intestinal microflora of fish: a review.

In <http://www.science.mcmaster.ca/Biology/4S03/Gut.htm>

29. Shivaji S., M.K. Ray, N. Shyamala, M. Rao, L. Saisree, M.V. Jagannadham, G. Seshu Kumar, G.S. Reddy and P. Bhargava. 1992. *Sphingobacterium antarcticus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium from soils of Schimacher Oasis, Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42** :102-106.
30. Law B.A., C.M. Cousins, M.E. Sharpe and F.L. Davies. 1979. Psychrotrophs and their effects on milk and dairy products. In: "Cold tolerants microbes in spoilage and the environment". Edited by A. D. Russell and R. Fuller. Academic Press, (N.Y.) : 137-152.
31. Nickelson R. and G. Finne. 1984. Fish, crustaceans, and precooked seafoods. In: "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". 2° ed. Edited by M. Speck. Am. Public. Health Assoc. (Washington, D.C) : 573-589.
32. Wiebe W.J., J.R. Sheldon and L.R. Pomeroy. 1992. Bacterial growth in the cold: evidence for an enhanced substrate requirement. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:359-364.
33. Margesin R., N. Palma, F. Knauseder and F. Schinner. 1991. Proteases of psychrotrophic bacteria isolated from glaciers. *J. Basic Microbiol.*, **31** : 377-383.
34. Secades P., B. Alvarez and J.A. Guijarro. 2001. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:2436-2444.
35. Caria M.A. 1981. Investigación de la flora bacteriana de peces marinos y la correlación con su ambiente. Incidencia de *Vibrio/Beneckeia* spp. en flora bacteriana intestinal. *Rev. Museo Arg. Ccias Nat. «B. Rivadavia»*, 313:317.
36. Baumann L., P. Baumann, M. Mandel and R.D. Allen. 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.*, **110**:402-429.
37. Poffe R. and W. Mertens. 1988. Heat-stable proteases of psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**:437-442.
38. Griffiths M.W., J.D. Phillips and D.D. Muir. 1981. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**:289-303.
39. Caria M.A. y J.M. Casellas. 1971. Bacteria marinas heterótrofas aerobias aisladas del Mar Argentino I.- Distribución y grupos fisiológicos. *Rev. As. Arg. de Microb.*, **3**:36-45.
40. Casellas J.M., M.A. Caria y M. Murtagh. 1971. Bacteria marinas heterótrofas aerobias aisladas del Mar Argentino II.- Taxonomía y nutrición. *Rev. As. Arg. de Microb.*, **4**:46-57.
41. Elena B. y L. Monticelli. 1998. Estudio taxonómico y ecológico de las bacterias marinas de la Antártida. *Publ. Com. Téc. Mix. Fr. Mar.*, **17**:97-106.
42. Estevao Belchior S., A. Gallardo, S. Risso, y M. Fajardo. 2003. Evaluación microbiológica del alga comestible *Porphyra columbina*, Montagne, de la costa patagónica argentina. *Rev FABICIB*, **7**:55-64.
43. Gallardo A., M. Fajardo, S. Risso y S. Estevao Belchior. 2004. Caracterización de poblaciones microbianas presentes en el macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock. *Rev. Arch. Latinoam. Nutric.*