

## Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock

Adriana Alicia Gallardo, Susana Risso, María Angélica Fajardo, Silvia Esteveo Belchior

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Patagonia San Juan Bosco.  
Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina

**RESUMEN.** Se evaluó la calidad microbiológica del alga *Monostroma undulatum*, Wittrock que se desarrolla en la costa patagónica, para el consumo humano y se analizó la diversidad y el rol de la población bacteriana que la coloniza naturalmente. Las muestras de algas fueron recolectadas en las costas de Puerto Deseado Provincia de Santa Cruz, Patagonia Argentina (47° 45' L.S., 65° 55' L.O.). Se investigaron bacterias heterótrofas psicrótrofas, heterótrofas marinas, bacterias de bajo requerimiento nutricional (BBRN), bacterias de bajo requerimiento nutricional marinas (BBRN marinas), Vibrios sp, coliformes totales, coliformes termotolerantes, bacterias anaerobias sulfito reductoras de esporas, hongos y levaduras. Se seleccionaron cepas que fueron caracterizadas de acuerdo a su morfología, tinción de Gram, fisiología y metabolismo. Las mismas se identificaron presuntivamente como: *Vibrio* (20%), *E. coli inactiva* (18%), *Flavobacterium* (11%), *Flexibacter* (9%), *Moraxella* (9%), grupo *Alcaligenes/Pseudomonas* (9%), *Aeromonas* (2%), *Acinetobacter* (2%), *Cotophaga* (2%), *Photobacterium* (2%), grupo *Ps/Caulobacter/Alteromonas/Spirillum* (2%). Entre los microorganismos Gram positivos se destacó el género *Staphylococcus*. Entre las cepas estudiadas, no se detectaron especies patógenas para el hombre. En algas frescas como así también en el agua de mar, no se detectó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal. Estos resultados indicarían una calidad microbiológica del alga aceptable para la alimentación humana. La población bacteriana asociada a *Monostroma undulatum* estuvo compuesta principalmente por microorganismos Gram negativos, psicrótrofos, marinos y comprendió una gran variedad de géneros, predominando los vibrios y las enterobacterias. Asimismo las bacterias identificadas presentaron una gran capacidad de hidrolizar diferentes sustratos y así podrían contribuir en la cadena trófica marina de este ecosistema marino al que pertenecen las algas.

**Palabras clave:** Recurso alimenticio, poblaciones microbianas, *Monostroma undulatum*.

### INTRODUCCION

Las algas son utilizadas como potencial recurso para el consumo humano (1,2). En países orientales como Japón, China y Corea se adicionan como ingredientes en distintas preparaciones culinarias, por ejemplo el Ao Nori que es una mezcla de algas verdes compuesta por *Ulva*, *Enteromorpha* y

**SUMMARY.** Characterization of microbial population present in the edible seaweed, *Monostroma undulatum*, Wittrock. The microbiological quality of *Monostroma undulatum*, Wittrock from the Southern Argentinean coast, was studied for its application for human food. Also the diversity and function of the native bacterial population to this green seaweed was analyzed. Samples were collected in Puerto Deseado, province of Santa Cruz, Southern Argentina (47° 45' L.S., 65° 55' L.W). The samples were analyzed for the presence of psychotrophic heterotrophic bacteria, marine heterotrophic bacteria, low nutritional request bacteria (LNRB), marine low nutritional request bacteria (LNRB marine), *Vibrio* spp, total and thermotolerant coliform bacteria, anaerobic sulfite reducing bacteria, yeasts and moulds. The isolates were identified using standard techniques based on morphologic, physiologic and metabolic characteristics. Among the gram-negative bacteria isolated, the predominant genera belonged to *Vibrio* (20%), *E. coli inactiva* (18%), *Flavobacterium* (11%), *Flexibacter* (9%), *Moraxella* (9%), *Alcaligenes/Pseudomonas* group (9%), *Aeromonas* (2%), *Acinetobacter* (2%), *Cotophaga* (2%), *Photobacterium* (2%), *Ps/Caulobacter/Alteromonas/Spirillum* group (2). The main genus of gram-positive bacteria was *Staphylococcus*. Human pathogenic bacteria were not detected. Fecal contamination indicator bacteria were not isolated from fresh seaweed and seawater. These results showed an adequate microbiological quality of seaweed acceptable for human food. The bacterial population associated to *Monostroma undulatum*, consisted of gram-negative, marine and psychotrophic microorganisms, including vibrios and enterobacteria as their main components. Also the identified bacteria showed a great capacity to hydrolyze different substrates and so they might contribute to the balance of this marine ecosystem.

**Key words:** Nutritional resource, microbial population, *Monostroma undulatum*.

*Monostroma* (2,3).

Desde el punto de vista nutricional, las algas son apreciadas por su composición química rica en proteínas, minerales, vitaminas, hidratos de carbono y fibra dietaria (4). Actualmente han sido consideradas a nivel mundial como una fuente importante de nutrientes esenciales, siendo creciente su incorporación en las dietas occidentales (1,5).

Entre las algas que tienen potencial aprovechamiento económico para la industria alimenticia se encuentran las pertenecientes al género *Monostroma* presentada por la especie *undulatum* (4). La misma se desarrolla en el mesolitoral marítimo de la Patagonia Argentina y su distribución geográfica es amplia, abarca desde Bahía Camarones hasta Tierra de Fuego (4). Teniendo en cuenta, su abundancia en las costas patagónicas, su potencial valor económico y su contenido en nutrientes se han considerado como un recurso alimenticio que debiera ser explotado (4). Esta especie se podría consumir en fresco, en tortillas o molida seca como condimento.

Además las algas marinas tienen una importancia fundamental como alimento natural para los organismos acuáticos explotados por el hombre, incluyendo peces y bivalvos. Las mismas son colonizadas por bacterias procedentes del ambiente marino donde se desarrollan. Estos micronichos, participan activamente de la degradación de las algas mediante la acción de enzimas hidrolíticas (6). Por este motivo, constituyen un eslabón importante en la cadena trófica, no solo por su participación en la degradación de la materia orgánica y liberación de los elementos minerales, sino también por su participación en los ciclos del carbono y del nitrógeno en los ecosistemas marinos (7). La microbiología marina sufre constantes modificaciones en función de la propia evolución de la degradación de la materia orgánica (7).

Actualmente no se ha publicado información sobre la microbiología de este recurso, por ello se plantearon como objetivos, (i) evaluar la calidad microbiológica del alga verde *Monostroma undulatum* para el consumo humano y (ii) estudiar la biodiversidad, en base a las características fisiológicas y metabólicas, de la población bacteriana que coloniza naturalmente a la microalga.

## MATERIAL Y METODOS

### Descripción de alga

*Monostroma undulatum* es un alga verde (*Chlorophyta*), se presenta como talos laminares de textura sedosa que se une a la restinga rocosa mediante un grampón. Esta forma corresponde a la fase macroscópica del alga, tiene un aspecto similar a la lechuga y se desarrolla en los meses de primavera. Al final de este período se observa un cambio de textura, se diferencia en tejido fértil, transformándose en una masa mucosa de color verde brillante, con liberación de zoospora. Este proceso conduce a la desintegración de alga, desde el borde externo de la lámina hacia el centro, culminando con la aparente desaparición cuando pasa totalmente a la fase microscópica (8).

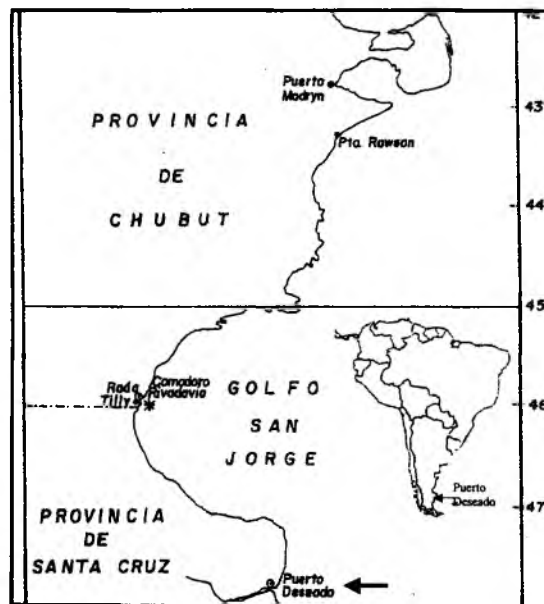
### Lugar del muestreo

Las muestras se extrajeron manualmente del sustrato rocoso del intermareal de Puerto Deseado, provincia de Santa Cruz,

Argentina (47° 45' L.S., 65° 55' L.O.), donde se encuentra la colonia más importante de algas de la Patagonia Argentina (Figura 1).

El período de muestreo comprendió el mes de noviembre del 2000 y los meses de octubre y noviembre del 2001.

FIGURA 1  
Ubicación geográfica del sitio de muestreo



### Toma de muestra

Se recolectaron al azar y en forma manual muestras de algas frescas de *Monostroma undulatum*, las mismas se recogieron en bolsas de polietileno asépticas. Simultáneamente, se registraron los datos de temperatura y pH en el agua de mar y se recolectaron muestras superficiales en recipientes estériles, para análisis bacteriológico.

Para el procedimiento las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut), en condiciones de refrigeración (4-8°C). Las algas se analizaron dentro de las 24 h, desde su cosecha.

### Procesamiento de las muestras

En el laboratorio se procedió a la separación de unidades muestrales de 10g de algas. Cada una de ellas se colocó en un recipiente de vidrio, conteniendo como diluyente agua de mar adicionada con 0,1% de peptona de carne, esterilizada. Se homogeneizó durante un minuto con una trituradora de cuchillas de acero inoxidable, previamente desinfectada con alcohol al 70%.

Posteriormente se efectuaron diluciones seriadas con agua de mar estéril (1/10 y 1/100) u se realizaron las siembras para recuentos.

**Recuentos bacterianos, método de siembra e incubación**

Se realizaron recuentos para bacterias heterótrofas psicrótrofas y mesófilas, heterótrofas marinas, bacterias de bajos requerimientos nutricionales (B.B.R.N.), bacterias de bajos requerimientos nutricionales marinas (B.B.R.N. marinas), *Vibrios* sp, hongos y levaduras, utilizando el método estándar de diseminación en superficie (9,10).

Para coliformes totales, coliformes fecales se empleó el método de recuento de número más probable (N.M.P) (10).

Bacterias heterótrofas psicrótrofas y mesófila: en agar para recuento en placa (g/lt: peptona de caseína 5,0; extracto de levadura 2,5; D (+) glucosa 1,0; agar-agar 14,0-pH 7,0 + 0,1) se incubó a 22°C y 35°C respectivamente, durante 4 días.

Bacterias heterótrofas marinas: en agar Zobell (g/100 ml: peptona de carne 0,5; agar 0,3; agua de mar filtrada 75 ml; agua destilada 25 ml-pH 7,5) a 22°C, durante 4 días.

Bacterias de bajos requerimientos nutricionales (B.B.R.N.). Se utilizó agar R2A (g/lt: extracto de levadura 0,5; peptona proteasa 0,5; casamino ácido 0,5; glucosa 0,5; almidón 0,5; piruvato de sodio 0,3; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H 0,3; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5,0; agar-agar 14,0-pH 7), se incubó a 22°C durante un período de 4 días.

Bacterias de bajos requerimientos nutricionales marinas (B.B.R.N. marinas): se sembró en agar R2A adicionados con 2% de NaCl, se incubó a 22°C, durante un período de 4 días.

*Vibrios* sp, en agar tiosulfato, citrato bilis, sacarosa (TCBS), a 22°C, durante 48 horas.

Coliformes totales y termotolerantes: en caldo Mc. Conkey, a 37,5 y 44,5°C respectivamente durante 48 horas.

Hongos y levaduras: en agar Sabouraud a 30°C, durante 7 días.

Bacterias anaerobias sulfito reductoras formadoras de esporas: se realizaron recuentos en medio diferencial para clostridios (DRCM), con agregado de un 0,3% de agar, distribuidos en tubos con 9 ml y esterilizados. Una vez sembrados los medios con 1 ml de homogeneizado de la muestra y de diluciones sucesivas, se colocaron durante 30 minutos a 70°C y posteriormente se incubaron durante 7 días a 35°C.

**Expresión de los resultados y análisis estadístico**

Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (u.f.c) y en número más probable (N.M.P), por gramo de alga.

Para el análisis, los datos se transformaron a logaritmo en base a 10. Los mismos fueron expresados como promedio ± desviación estándar. Para evaluar las diferencias entre los promedios de los recuentos de los distintos grupos bacterianos, se utilizaron el método de Kruskal-Wallis y el de comparaciones múltiples de Dunn's como prueba post-test (11).

**Análisis bacteriológico del agua de mar**

Los parámetros bacteriológicos examinados fueron: coliformes totales, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). El análisis se realizó según las técnicas normalizadas (9).

**Caracterización fenotípica**

De los distintos grupos bacterianos se selecciono al azar colonias morfológicamente diferentes y se registraron sus características distintivas (morfología, tamaño, pigmentos, consistencia). Las cepas se purificaron mediante el método de siembra por estrías en placas de agar ZoBell, y se repicaron en pico de flauta del mismo medio.

Las mismas fueron identificadas presuntivamente hasta género de acuerdo al esquema para bacterias marinas descrito por Oliver (12) y el manual Bergey's (13). Para la clasificación de las cepas se seleccionaron distintas pruebas (Figura 2) para determinar las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de sensibilidad de antimicrobianos según se detalla a continuación (14,15).

FIGURA 2

Pruebas realizadas para caracterizar las cepas aisladas

- 
- A) Morfología
- Forma bacteriana
  - Tinción de Gram
  - Movilidad
  - Pigmentación
- B) Fisiología
- Características térmicas
  - Tolerancia a distintos valores de pH
  - Requerimientos salinos
- C) Bioquímica
- Prueba de oxidación-fermentación (Medio O/F glucosa)
  - Producción de Índol
  - Ferm Gluc-Lac/Sac-Producción de gas y SH<sub>2</sub>
  - Presencia de enzimas: catalasa, oxidasa, DNAasa, gelatinasa, amilasa, lipasa, caseínasa, agarasa, lecitinasa, hemolisina
  - Producción de pigmentos: melánicos, piorrubina, fluoresceína/piocianina
  - Crecimiento en medio de citrato de Simmons
  - Reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>
  - Denitrificación
  - Fermentación de manitol
- D) Sensibilidad a antimicrobianos
- Penicilina (10U)
  - Polimixina B (300U)
  - Vibriostático O/129 (150 µg)
- 

Gluc: glucosa, Lac: lactosa, Sac: sacarosa.

Tinción de Gram; movilidad en medio SIM adicionado con 2% de NaCl; requerimiento de O<sub>2</sub> en medio tioglicolato adicionado con 2% de NaCl.

La tolerancia a distintas concentraciones de NaCl, fue ensayada en agar ZoBell preparado con agua destilada, variando el porcentaje de NaCl en el medio a las concentraciones 0%, 0,5%, 1%, 3%, 5%, 7% y 10%. Cada una de las cepas fue sembrada e incubada a 22°C por 48 horas, luego se registró la presencia o ausencia de desarrollo bacteriano en la placa. Se descartaron a los 15 días de incubación.

Se evaluó el crecimiento a distintas temperaturas de cada cepa, sembrándolas en agar ZoBell e incubándolas a las siguientes temperaturas: 4°C, 7°C, 22°C, 30°C, 37°C, 42°C, por período de 7 días.

El desarrollo a distintos valores de pH se realizó en caldo Zobell y el gradiente de pH ensayado fue: 5,6,7,8,9. La incubación se realizó en todos los casos a 22°C por 48 a 72 horas. Luego se registró la presencia o ausencia de desarrollo, por la turbidez en el caldo.

Las cepas fueron analizadas con el fin de determinar sus características metabólicas y lograr una identificación presuntiva al nivel de género. Para ello se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de oxidación-fermentación (OF), oxidas, prueba catalasa, indol, reducción de nitrato, producción de enzimas: DNAasa, amilasa, lipasa, caseinasa, gelatinasa, agarasa, lecitinasa, ureasa, hemolisina, predicción de pigmentos: melánicos, piorrubina, fluoresceína/piocianina.

Se ensayó la susceptibilidad al agente vibriostático O/129 (150 µg), y a los antibióticos penicilina (monodiscos de 10U)

y polimixina B (monodiscos de 300U).

Los medios de cultivo se prepararon siguiendo la metodología estándar (14,15), siendo modificados por la adición de NaCl en una concentración de 2% (p/v).

Las pruebas de identificación se incubaron a la temperatura ambiente (22-25°C) por 48 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Recuentos bacterianos en agua de mar y en algas frescas

En el agua de mar, en el sitio donde se cosechó el alga *Monostroma undulatum*, se registraron temperaturas entre 8-9°C y valores promedios de pH y salinidad de 8,6 y 33,2g/l respectivamente. El análisis bacteriológico, no reveló la presencia de coliformes totales ni termotolerantes en ninguna de las muestras analizadas. Solamente, en una de las misma se detectó la presencia de *Enterococcus sp.* Con un valor de 2 N.M.P. por 100 mil. En concordancia con lo informado por otros autores en zonas cercanas a los sitios de muestreo de este trabajo (16), los resultados se hallaron por debajo de los límites establecidos por normas internacionales (17) para su uso con fines recreacionales, pesca, navegación y vida acuática.

Los recuentos de los distintos grupos bacterianos que se encontraron naturalmente asociados a las algas, recolectadas durante los dos años de muestreo, se presentan en la Tabla 1 (expresados como promedios). Para el tratamiento los datos fueron transformados a logaritmo en base 10 (log).

No se obtuvo desarrollo de coliformes totales, termotolerantes, *Escherichia coli*, hongos, levaduras y bacterias anaerobias sulfito reductoras formadoras de esporas.

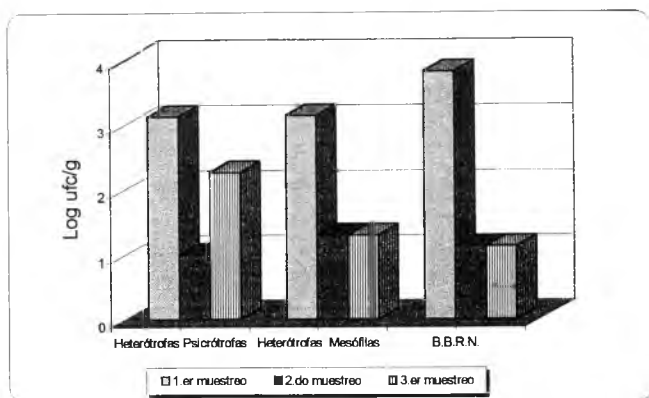
TABLA 1  
Valores promedios de recuentos bacterianos (expresados en log de u.f.c./g ± desviación estándar)

Fecha	Heterótrofas			B.B.R.N.*	B.B.R.N.** marina	<i>Vibrios sp.</i>
	psicrótrofa	mesófilas	marinas			
	Condiciones de incubación					
	22°C-96 h	37°C-96h	22°C-96h	22°C-96h	22°C-96h	22°C-48h
Primer muestreo (noviembre 2000)	3,14±1,24	3,14±1,22	3,92±0,39	3,82±0,57	3,94±0,21	3,06±0,41
Segundo muestreo (octubre 2001)	1±0	1,3±0,40	4,04±0,41	1,13±0,41	No determinado	2,97±0,86
Tercer muestreo (noviembre 2001)	2,27±0,80	1,3±0,40	4,56±0,42	1,13±0,41	3,32±0,79	2,74±0,72
Promedio total (n=30)	2,13±1,07	1,9±1,06	4,17±0,34	2,02±1,55	3,63±0,44	2,92±0,16

n: número de muestras procesadas, (\*) B.B.R.N: bacterias de bajos requerimientos nutricionales (aisladas en R2A), (\*\*) B.B.R.N. marinas: aisladas en R2A con 2% de NaCl.

Estadísticamente se demostró que los recuentos de bacterias psicrótrofas, mesófilas y B.B.R.N., resultaron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en la primera campaña de muestreo a comparación de los obtenidos en los dos siguientes. En la Figura 3 se puede observar las diferencias entre los promedios de los recuentos bacterianos obtenidos en las tres campañas de muestreo realizadas. Este resultado podría ser consecuencia de la acción de una variedad de factores no controlables como por ejemplo: la afluencia de aves, diferencia en los horarios de bajar, la incidencia directa de vientos, que de acuerdo al período de exposición de las algas podrían favorecer la desecación de este ecosistema durante las horas de bajar, provocando situaciones de stress bacteriano con bajos recuentos.

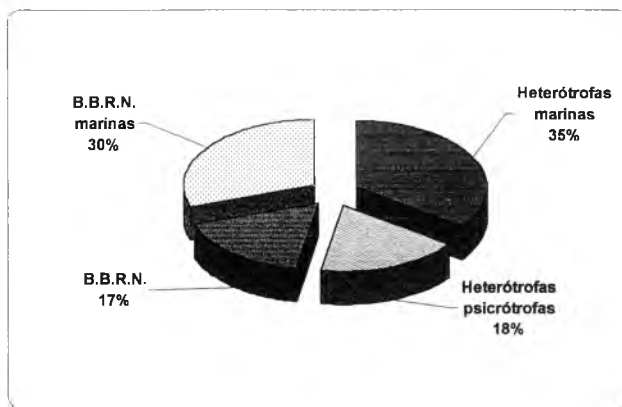
FIGURA 3  
Promedios de recuentos bacterianos



Por otra parte, en el aislamiento de los microorganismos influyen variables que dependen de las características del medio de cultivo utilizado inicialmente (la salinidad, el pH y la presencia de compuestos que cubran los requerimientos nutricionales de distintos tipos de bacterias) y de las condiciones de incubación (atmósfera, tiempo y temperatura) (18). La distribución en porcentaje (%) de los distintos grupos bacterianos se presentó en la Figura 4. En la misma se observó el predominio de las bacterias marinas, tanto heterótrofas como las de bajo requerimientos nutricionales (B.B.R.N. que desarrollaron en R2A adicionado con NaCl). Estadísticamente, se comprobaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los recuentos de ambos tipos de bacterias marinas y sus homólogos que desarrollaron en medios sin NaCl.

Por el contrario, al comparar los resultados entre los recuentos de bacterias que desarrollaron en medios nutricionales diferentes (heterótrofas psicrótrofas y B.B.R.N. desarrollados en R2A) no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, la concentración de los nutrientes del medio no sería un factor tan influyente como la salinidad, para lograr una mayor recuperación de los microorganismos autóctonos asociados a esta macroalga.

FIGURA 4  
Distribución en porcentaje de las distintas poblaciones bacterianas aisladas: heterótrofas psicrótrofas, heterótrofas psicrótrofas marinas, B.B.R.N. y B.B.R.N. marinas



**Caracterización fenotípica de las cepas estudiadas**

Se seleccionaron y estudiaron 55 cepas aisladas en los distintos medios de cultivo. Las colonias se caracterizaron en general por ser circulares con bordes lisos y elevadas con un tamaño de 2 a 3 mm y de aspecto mucoso. En menor número, se aislaron colonias medianas, planas con bordes irregulares, rugosas y consistencia friable y otras grandes y extendidas sobre la superficie del agar.

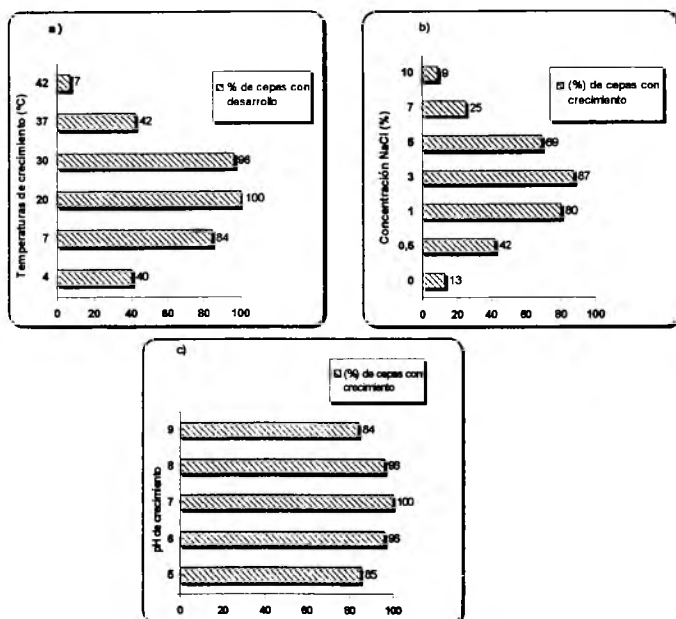
El 49% de las colonias seleccionadas manifestaron la producción de pigmentos de distintas gamas de colores rojos, anaranjados y amarillos. La síntesis de pigmentos es usual en bacterias que se desarrollan en ambientes acuáticos. Estos actúan en forma protectora frente a la acción fotodinámica de la luz solar, a la que suelen estar expuestos principalmente aquellos microorganismos que permanecen en la superficie (19).

Con respecto a la morfología bacteriana se destacó la dominancia de bacilos Gram negativo (89%). Las restantes resultaron bacilos y cocos no agrupados Gram positivos. Este resultado se correlacionó con estudios previos realizados por otros investigadores (19-24), que demostraron que el 90% de la biota de los ecosistemas acuáticos se compone mayormente de bacterias Gram negativas. Estos últimos, mantienen ligadas a su pared celular y/o excretan numerosas enzimas hidrolíticas y por ello son capaces de digerir sustratos exógenos rápidamente. En cambio, los Gram positivos son competidores pobres por los nutrientes en ecosistemas marinos fríos y desarrollan, preferentemente, en hábitat donde existe una alta concentración de materia orgánica como por ejemplo en los sedimentos marinos (7).

Los resultados de los ensayos realizados, para evaluar el crecimiento de cada una de las cepas, bajo diferentes condiciones de temperaturas, pH y salinidad se registraron en la Figura 5.

FIGURA 5

Distribución de las 55 cepas analizadas según el crecimiento de diferentes (a) temperaturas, (b) concentraciones de NaCl y (c) pH, (expresado en porcentaje)



Con respecto al desarrollo a distintas temperaturas, los microorganismos estudiados desarrollaron en mayor porcentaje entre 7 y 30°C, correspondiéndose por ello con el grupo térmico de bacteria psicrótrofos (Figura 5 a). Según Morita (25) las bacterias psicrótrofos pueden desarrollar de 0 a 5°C y hasta temperaturas superiores a 30°C, exhibiendo un crecimiento óptimo a temperaturas mayores a 15°C. A 37°C solamente desarrollo el 42% de las cepas y a 42°C el crecimiento fue muy reducido (7%). Esto podría atribuirse a que en los microorganismos psicrótrofos, que han adaptado su metabolismo para poder sobrevivir y desarrollar en ambiente fríos, las temperaturas superiores a 30°C provocan alteraciones como por ejemplo: desorganización intracelular con inactivación de enzimas o complejos enzimáticos, la aceleración del uso del pool de aminoácidos, el incremento de la saturación de lípidos y/o la pérdida de la permeabilidad de la pared celular. Estos cambios conducen a la lisis bacteriana inducida térmicamente (19,25).

Con respecto a los requerimientos salinos, la población en estudio podría clasificarse como bacterias marinas, según el criterio establecido en Stainer y cols. (26), debido a que el 87% de las cepas mostraron requerimientos salinos para su desarrollo y en su mayoría (64%) crecieron en un rango de concentraciones de NaCl entre 1% y 5%. Solamente, un reducido porcentaje (13%) desarrolló en ausencia de la sal, indi-

cando que este grupo, probablemente, serían bacterias del tipo terrestre adaptadas al ambiente marino (26). EL 25% y 9% de las bacterias toleraron hasta concentraciones del 7% y 10% de NaCl, respectivamente (Figura 5 b).

Cuando el Na<sup>+</sup> fue reemplazado por K<sup>+</sup>, desarrollaron un alto porcentaje de cepas (67%). El rol fisiológico del sodio aún no está bien claro, este ión sería necesario para la estabilidad de las membranas, actividad enzimática, transporte activo y el funcionamiento de una bomba de sodio que está acoplada a la cadena respiratoria (27). Se ha postulado que las bacterias marinas no requieren exclusivamente sodio para su desarrollo, sino también cloruros, bromuros y otros iones (7).

En relación con las variaciones de pH del medio de cultivo, los microorganismo desarrollaron en el rango comprendido entre valores 5 y 9, con un óptimo entre 6 y 8 (Figura 5 c). Este resultado podría ser atribuido a la habilidad de las bacterias marinas a adaptarse a distintas condiciones ambientales de pH (24),

Conforme a los resultados obtenidos de los ensayos de crecimiento a distintas temperaturas, pH y concentraciones de salinas, entre el 80% y 90% de las cepas seleccionadas, autóctonas de algas frescas *Monostroma undulatum*, estarían fisiológicamente adaptadas a las condiciones ambientales del ecosistema acuático de procedencia, donde la temperatura media es de 9°C, la salinidad media de 3,3 % (p/v) y el pH 8,6.

Entre las cepas seleccionadas, de los diferentes medios de cultivo, se destacaron los microorganismos Gram negativos anaerobios facultativos (69%).

El 60% de las cepas mostró la capacidad de reducir nitratos a nitritos. Este resultado podría estar indicando la participación de estos microorganismos en el ciclo del nitrógeno. Sin embargo la capacidad de desnitrificación, fue francamente baja. La producción de nitritos unida a la ausencia de desnitrificación, sugeriría que otros microorganismos no aerobios o no heterótrofos, posiblemente sean los responsables del consumo de nitritos que continuaría con el ciclo del nitrógeno (28).

En la Tabla 2 se indican los porcentajes de resultados positivos de las pruebas metabólicas realizadas.

Las cepas estudiadas en este trabajo, mostraron la capacidad de sintetizar un variado espectro enzimático: ureasa, proteasa (gelatinasa y caseínasa), lipasa, lecitinasa, hemolisina y otras enzimas capaces de degradar macromoléculas como agar, polisacáridos de reserva (almidón) y DNA. La síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas bacterianas resulta ser ventajosa para el micronicho al que pertenecen dichas bacterias marinas. Esto es debido a que todos los organismos que lo conforman se benefician utilizando los productos de hidrólisis de las enzimas, que liberan al medio las bacterias marinas (6).

Sobre la base de las pruebas de identificación realizadas,

la caracterización en géneros de las cepas seleccionadas fue dificultosa. Las determinaciones bioquímicas y fisiológicas deberían complementarse con la información que proveen los métodos moleculares que se utilizan en estudios filogenéticos de las poblaciones marinas, como por ejemplo el análisis de secuencias de 16S rDNA (29,30).

**TABLA 2**  
Distribución porcentual en función de las de características fenotípicas de las cepas

Pruebas	Porcentajes de cepas positivas (N=55)	Pruebas	Porcentajes de cepas positivas (N=55)
Gram negativo	89	Indol	27
Gram positivo	11	ADNasa	40
Movilidad	49	Ureasa	7
Catalasa	91	Agarasa	11
Oxidasa	49	Gelatinasa	74
Red. de NO <sub>3</sub>	60	Caseína	67
Desnitrificación	2	Lecitinas	71
Catabolismo glucosa		Amilasa	65
Fermentativo	42	Lipasa	38
Oxidativo	11	Hemolisina	49
Inerte	47	Pigmentos melánicos	34
Producción H <sub>2</sub> S	11	Otros pigmentos	9

Si bien existen algunos esquemas taxonómicos para identificar los microorganismos aislados de ecosistemas marinos (12), se han clasificado nuevos géneros y especies en este ambiente (31-33) que solamente pueden diferenciarse mediante métodos moleculares. Por ello, los resultados se informaron como identificación presuntiva.

De acuerdo al esquema propuesto por Oliver (12) y a criterios de diferenciación bioquímica entre géneros propuestos en el Manual Bergey's (13), los géneros identificados fueron: \**Vibrio sp.* caracterizados en base a las pruebas de identificación, la sensibilidad al agente vibriostático O/129 y desarrollo en agar T.C.B.S. Las cepas fermentadoras de glucosa, oxidasa positiva, que desarrollaron en T.C.B.S. y fueron sensibles al agente O/129, se evaluaron bioquímicamente para diferenciarlas de especies de *Vibrio* de importancia clínica. Para ello se consideraron los resultados de las pruebas de fermentación de lactosa, sacarosa y manitol, rojo de metilo, Vorges-Proskauer, reducción de nitritos, producción de indol, hidrólisis de urea, producción de lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, arginina dihidrolasa, lipasa, gelatinasa, amilasa y DNasa, pruebas de halofiliismo, desarrollo a distintas temperaturas y producción de pigmentos. De acuerdo a los resultados obtenidos no se estableció relación con especies de *Vibrio* patógenas para el hombre. Por ese motivo, estas cepas fueron clasificadas presuntivamente como *Vibrio sp.*

\*\*Enterobacterias, en segundo término de importancia, identificadas como *Escherichia coli* inactiva debido a la incapacidad de fermentar la lactosa y/o hacerlo en forma retardada (prueba de β-galactosidasa +), inmovilidad y por no producir gas por fermentación de hidratos de carbono. \*\*\*Además, se identificó un bajo porcentaje de cepas compatibles con los géneros *Aeromonas* y *Photobacterium*. \*\*\*\* Las cepas restantes (no fermentadoras), mostraron una amplia distribución de géneros. Las mismas se identificaron presuntivamente como: *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Moraxella*, *Citophaga*, *Acinetobacter*, grupo *Alcaligenes/Pseudomonas (Ps)*, grupo *Xanthomonas/Flavobacterium*, grupo *Pseudomonas/Caulobacter/Alteromonas* y *Spirillum*.

Estos géneros fueron recuperados como miembros de distintos nichos marinos por otros investigadores y se especializan en la degradación de macromoléculas muy complejas (30,34,35).

Los porcentajes de prevalencia de organismos compatibles con cada género se detallaron en la Tabla 3.

**TABLA 3**  
Géneros presuntivamente identificados (expresado en porcentajes)

Géneros	(%) de cepas (N=55)
Bacilos Gram negativos	
<i>Vibrios</i>	20
<i>Escherichia</i>	18
<i>Flavobacterium</i>	11
<i>Flexibacter</i>	9
<i>Moraxella</i>	9
Grupo <i>Alcaligenes/Pseudomonas (Ps)*</i>	9
<i>Citophaga</i>	2
<i>Photobacterium</i>	2
<i>Aeromonas</i>	2
<i>Acinetobacter</i>	4
Grupo <i>Xanthomonas/Flavobacterium*</i>	2
Grupo <i>Ps/Caulobacter/Alteromonas/Spirillum*</i>	2
Gram positivos	
<i>Staphylococcus</i>	7
Bacilos no identificados	3

\* En estos grupos se encuentran cepas de características fenotípicas compartidas entre los géneros.

### CONCLUSIONES

Los análisis bacteriológicos del agua de mar y de las algas frescas demostraron que la especie *Monostroma undulatum*, obtenida en las costa de Puerto Deseado (Provincia de Santa Cruz), podría considerarse de buena calidad microbiológica

para el consumo humano y su hábitat natural sería bacteriológicamente propicio para su desarrollo.

La población bacteriana autóctona de *Monostroma undulatum* se caracterizó por un amplio predominio de bacilos Gram negativos con requerimientos salinos para poder desarrollar. Crecieron dentro del rango de temperatura de los microorganismos psicrótrofos. Presentaron gran versatilidad para multiplicarse tanto a valores de pH levemente ácidos como alcalinos. Las características fisiológicas de las bacterias se relacionan con las condiciones ambientales del ecosistema de procedencia.

En la población bacteriana estudiada se destacó un amplio potencial hidrolítico de macromoléculas, sugiriendo que podrían contribuir en la cadena trófica marina de este ecosistema.

Si bien se identificó una amplia variedad de géneros, predominaron los *Vibrios sp.* y enterobacterias. Entre las cepas pertenecientes a ambos géneros no se detectaron especies patógenas para el hombre.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración en este trabajo al técnico de laboratorio de la Facultad de Ciencias Naturales de la U.N.P.S.J.B. Emilio Escobar.

#### REFERENCIAS

- Camilo Domínguez S, Casas Valdez M, Ramos Ramos F, Pérez-Gil F, Sánchez Rodríguez I. Algas marinas de Baja California S, México: Valor Nutricional. Arch Latinoamer Nutr. 2002;52:400-405.
- Segovia Alfaro D. Una novedosa alternativa alimenticia. Énfasis alimentación. 2003;4:90-94.
- McHugh DJ (ed). Production and utilization of products from commercial seaweeds. Fao Fish Tech Pap. 1987;288:158-161.
- Risso SJ, Escudero CA, Estevao Belchior S, Portela ML, Fajardo MA. Contenido en algunos nutrientes del alga marina comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock, de la costa patagónica. Arch Latinoamer Nutr. 2003;53:306-311.
- Jiménez-Escrig A y Goñi Cambrón I. Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de microalgas marinas comestibles. Arch Latinoamer Nutr. 1999;49:114-120.
- Albertson N, Nyström T and Kjellberg S. Exoprotease Activity of Two Marine Bacteria during Starvation. Appl Environ Microbiol. 1990;49:114-120.
- Dawes CJ. Marine Botany. Edited by Wiley J. & sons, Inc. New York, U.S.A. 1981;23-55,587-607.
- Boraso AL. Reproducción de Ulvales de Puerto Deseado (provincia de Santa Cruz, República Argentina) II *Monostroma undulatum* Wittrock. Phycis sec A. 1977;36:1-7.
- APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Franson MA. (ed), American Public Health Assoc., Washington, D.C. 1994.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (I.C.M. S.F.). Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos, (Vol. I). Acirbia, Zaragoza, España 1980.
- Dowson-Saunders B y Trapp R. Bioestadística médica. Ira. Ed, El manual moderno, México. 1994.
- Oliver J. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. Deep-sea Res. 1982;29:795-798.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Edited by N.R. Krieg and J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1984.
- Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, sección 1. 19-1.20 y sección 5., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992.
- Smibert RM and Krieg RN. General characterization. In: Manual of methods for general bacteriology. Edited by Gerhardt P, Murray REG, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg RN and Phillips GB. American Society for Microbiology. Washington D.C. U.S.A., 1981;409-443.
- Estevez JL, Gil M, Commendatore M, Santinelli N, Sastre V, Solis M, Ocariz H y González Raies C. Evaluación de la contaminación urbana de la ría de Deseado (Prov. De Santa Cruz). Informe técnico del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica – Fundación Patagonia Natural (Puerto Madryn, Argentina). 1997;(36):1-1-50.
- Salas HJ. Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). OPS-OMS. 2000. Hojas de divulgación técnica 29.
- Nickelson R and Finne G. 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. 1984;573-589.
- Iañez Pareja E. En curso de microbiología general. 1998; <http://www.ucm.es/info/micro3/bact>.
- Bowman JP, McCammon S, Brown M, Nichols D and McMeekin T. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Appl Environ Microbiol. 1997;63:3068-3078.
- Baumann L, Baumann P, Mandel M and Allen RD. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. J Bacteriol. 1972;110:402-429.
- Caria MA. Investigación de la flora bacteriana de peces marinos y la correlación con su ambiente. Incidencia de *Vibrio/beneckea spp.* En flora bacteriana intestinal. Rev Museo Arg Ccias Nat. B. Rivadavia. 1981;313:317.
- Elena B y Monticelli L. Estudio taxonómico y ecológico de las bacterias marinas de la Antártica. Publ Com Téc Mix Fr Mar. 1998;17:97-106.
- Estevao Belchior SG. Actividad Proteolítica de Bacterias psicrótrofas y/o psicrófilas aisladas de muestras de merluza (*Merluccius Hubbsi*). Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de la Patagonia San Juan Bosco. 2003.
- Morita R. Psychrophilic Bacteria. Bacterial Rev. 1975;39:144-167.
- Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. In: Microbiología. Ed. Reverté S.A., Barcelona, España. 1988;218-219.

27. Oh S, Kogure K, Ohwada K and Simidu U. Correlation between possession of a respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup> requirement for growth of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:1844-1846.
28. Caria MA y Casellas JM. Bacterias marinas heterótrofas aerobias aisladas del Mar Argentino. I. Distribución y grupos fisiológicos. *Asociación Argentina de Microbiología.* 1971;3:36-45.
29. Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M, Baise E, Genicot S and Gerdy Ch. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;18:189-202.
30. Lobet-Brossa E, Rosselló-Mora R and Amann R. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:2691-2696.
31. Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P and Bertrand JC. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. Nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42:568-576.
32. Holmström C, James S, Neilan B, White D and Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas tunicate* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:1205-1212.
33. Sawabe T, Makino H, Tatsumi M, Nakano K, Tajima K, Mahbub Iqbal M, Yumoto I, Ezura Y and Christen R. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp nov., a marine bacterium that is the causative agent of red disease of *Laminaria japonica*. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:769-774.
34. Monticelli L y Costagliola M. Estudio bacteriológico de la merluza (*Merluccius hubbsi*) capturada en la zona común de pesca Argentino-Uruguay y de su ambiente. *Publ Com Téc Mex Fr Mar.* 1989;5:87-94.
35. Tejero A, Esteves E, Vallespinos F. Estudios bacteriológicos de la zona de afloramiento del NW de Africa (Campaña Atlor VII) I. Técnicas de identificación taxonómica y resultados. *Res Exp Cient B/O Comide.* 1978;7:59-76.

Recibido:21-01-2004

Aceptado: 14-06-2004