FRENTE MARITIMO
Vol. 5, Sec. A: 87-94 (1989)

ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE LA MERLUZA *(Merluccius hubbsi)* CAPTURADA EN LA ZONA COMUN DE PESCA ARGENTINO-URUGUAYA Y DE SU AMBIENTE[1,2]

Luis S. Monticelli y Marcela Costagliola

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero
Playa Grande, 7600 Mar del Plata, República Argentina

RESUMEN: En el presente estudio exploratorio vienen referidas las primeras observaciones microbiológicas de la microflora de la merluza *(Merluccius hubbsi)* capturada en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya en sus aspectos taxonómicos, fisiológicos y poblacionales; esto último mediante el empleo de un análisis numérico de las características térmicas de crecimiento.

Fueron estudiadas 214 cepas bacterianas (140 de origen intestinal, 38 de tegumento y 36 de agua) aisladas durante la campaña OB03/86 realizada en mayo de 1986 y 20, tomadas como referencia, aisladas durante la campaña H05/83 realizada en junio de 1983.

Desde un punto de vista genérico se observó un patrón de distribución de las bacterias presentes en intestino, tegumento y agua muy similar a lo visto oportunamente en merluzas capturadas en el sector nor-patagónico y en otros peces del Mar Argentino. Las Vibrionaceae fueron dominantes en intestino y agua mientras que el género *Pseudomonas* prevaleció en tegumento.

El estudio numérico de las asociaciones entre los distintos perfiles térmicos de la flora intestinal permitió dividir el área estudiada en dos zonas bien definidas, llamando la atención una pequeña, ubicada al sudeste, conformada por un solo grupo térmico y caracterizada por estar constituída por un 100% de microorganismos psicrotróficos y no menos de un 80% del tipo térmico 30 (tipo térmico encontrado dominante, y en algunos casos exclusivo en una serie de estudios preliminares realizados en merluza capturada en la Zona Patagónica).

El empleo de tipos térmicos numéricos, perfiles térmicos, con sus similitudes, conformamiento de grupos térmicos, delimitación de áreas, etc. se perfilan como herramientas a tener en consideración en los estudios ecologico-poblacionales de las bacterias y en las de sus relaciones con la fauna marina y el ambiente.

SUMMARY: BACTERIOLOGICAL STUDY OF THE HAKE *(Merluccius hubbsi)* CAUGHT IN THE ARGENTINE-URUGUAYAN COMMON FISHING ZONE AND OF ITS ENVIRONMENT.— This exploratory study contains the first microbiological observations of the microflora of the hake *(Merluccius hubbsi)* caught in the Argentine-Uruguayan Common Fishing Zone; in its taxonomic, physiological and population aspects; the latter by utilizing a numerical analysis on growth thermal characteristics.

Two hundred fourteen bacterial strains were studied (140 with intestinal origin, 38 tegument and 36 water) isolated during the OB03/86 campaign of May, 1986 and 20, taken as reference, that were isolated during the H05/83 campaign of June, 1983.

From a generic point of view, a distribution pattern of bacteria in intestine, tegument and water was noted as quite similar to that observed for hake caught within the Northern Patagonian Sector and for other fish in the Argentine Sea. The Vibrionaceae predominated in intestine and water while *Pseudomonas* spp did it in tegument.

The numerical study between associations of the various thermal profiles of the intestinal flora allowed a division of the reviewed area into well-defined zones; detaching a small area located to the Southwest formed by a single thermal group and composed by 100% of psichrotrophic organisms and no less than 80% of the thermal 30 type (a thermal type that was predominant, and in some cases exclusive, in a series of preliminary studies on hake caught within the Patagonian Zone).

The utilization of numerical thermal types, thermal profiles with their similitudes, conformation of thermal groups, demarcation of areas, etc., appear to be useful tools to be taken into account in ecological-population studies of bacteria and also their relationship with marine fauna and environment.

Palabras clave: Merluza, microbiología, ecología bacteriana, microbiología marina.

---

[1] Este trabajo fue presentado en el Cuarto Simposio Científico de la CTMFM, noviembre de 1979.

[2] Contribución del INIDEP N° 659.

INTRODUCCION

El estudio de la bacteriología marina es relativamente reciente en el país contando como pionera a la Dra. M.A. Caría la que, con un reducido equipo de colaboradores, ha realizado interesantes trabajos sobre distribución, taxonomía, grupos fisiológicos y nutrición de bacterias aisladas de agua, peces y sedimentos marinos (Caría, 1981; Caría y Casellas, 1971, 1978; Casellas *et al*, 1971, 1977). A partir de 1982, y ante la falta de referencias específicas respecto al análisis poblacional de la microflora presente en las principales especies de peces del Mar Argentino que sufren una explotación comercial y de sus ambientes de captura, el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) viene realizando estudios exploratorios tendientes a cubrir los diferentes ambientes de pesca. En dichos estudios, además de tratar aspectos taxonómicos básicos, se pone particular atención en el análisis de poblaciones, en sus aspectos descriptivos y comparativos (Monticelli y Costagliola, 1983, 1984, 1985).

En estudios poblacionales, donde se deben analizar y clasificar un gran número de cepas, se hacen necesario utilizar métodos analíticos rápidos y simples para intentar una clasificación a nivel genérico (claves simplificadas, etc.) o a nivel fisiológico (grupos fisiológicos); y un adecuado análisis comparativo.

En el presente estudio exploratorio vienen referidos los primeros datos microbiológicos de la merluza *(Merluccius hubbsi)* capturada en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya y en el análisis numérico de los perfiles térmicos de crecimiento de los microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

El material analizado provino fundamentalmente de la campaña OB03/86 realizada por el B/I *Cap. Oca Balda* en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya entre el 21 de mayo y el 9 de junio de 1986. A los efectos comparativos se analizaron además, algunos datos de la campaña H05/83 realizada por el B/I *Dr. E.L. Holmberg* en junio de 1983. La ubicación de las estaciones de captura, como así también las isotermas de 7°C y 12°C a nivel de la boca de la red observadas durante la campaña OB03/86 se indican en la Figura 1. Las merluzas fueron capturadas mediante red de arrastre de fondo, en lances de 30'. Se seleccionaron ejemplares que no presentaron alteraciones visibles por efecto del arte, los que fueron analizados inmediatamente en el laboratorio de la nave. Las muestras de tegumento fueron tomadas de la zona media lateral según el método utilizado por Georgala (1958), mientras las de contenido intestinal, mediante remoción de la porción media del intestino y suspensión de su contenido en agua de mar estéril. Las muestras de agua provenientes de los ambientes de captura fueron tomadas mediante botellas tipo Nansen de P.V.C., y transferidas inmediatamente a frascos de vidrio estériles. La temperatura se tomó con una sonda CTD.

Medios de cultivo, siembra y conservación de cepas

Las suspensiones de tegumento y del contenido intestinal, como así también alícuotas de las muestras de agua fueron sembradas por diseminación en superficie en placas de Agar Marino de ZoBell (peptona 5 g, extracto de levaduras 1 g, fosfato de hierro 0,05 g, agar 15 g, agua de mar envejecida 750 ml y agua destilada 250 ml - pH 7,5) e incubadas durante 7 días a 19°C ± 1°C. Se seleccionaron, al azar, una colección de colonias que se conservaron sembrándolas en profundidad, en un medio de conservación para bacterias marinas (peptona 5 g, agar 3 g, agua de mar envejecida 750 ml y agua destilada 250 ml -pH 7,5; se fracciona en tubos pequeños con tapa a rosca).

Estudio fisiológico - taxonómico

Una vez en el laboratorio se purificaron las cepas mediante diseminaciones sucesivas en Agar ZoBell. A cada cepa se le determinó: movilidad, utilización de la glucosa y producción de gas en el medio M-OF (Difco), presencia de oxidasa, coloración de Gram, morfología celular, producción de luminiscencia en Agar SWC (Ruby y Morin, 1979), producción de pigmento y morfología colonial en Agar ZoBell, capacidad de crecer a 2°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C y 45°C, producción de amilasa, gelatinasa y quitinasa, hidrólisis de la tributirina y presencia de inclusiones de poli B-hidroxi butirato. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados durante 15' a 121°C.

Una clasificación taxonómica presunti-

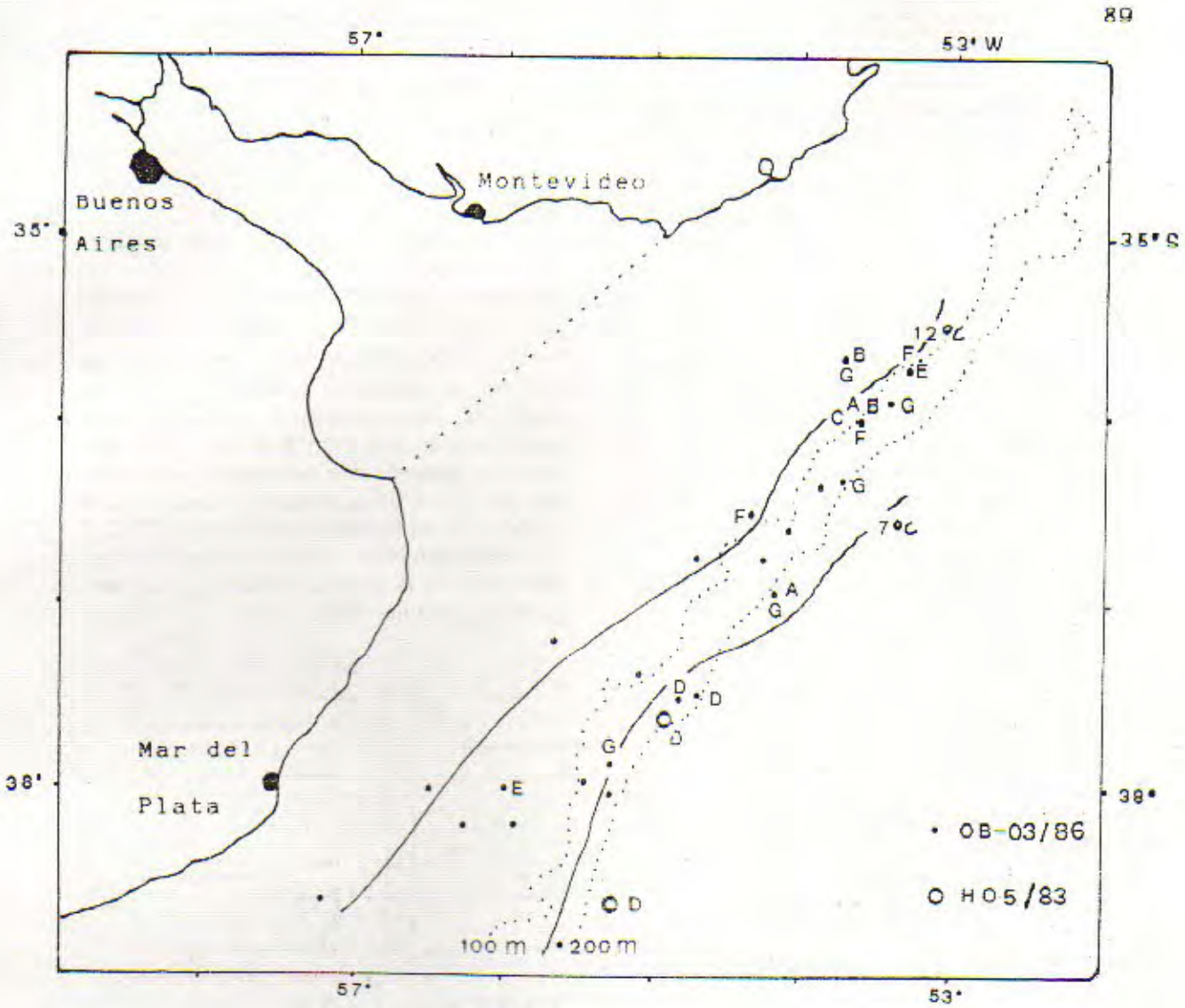

Fig. 1. Ubicación de las estaciones estudiadas, temperaturas a nivel de la red de la campaña OB-03/86 y grupos térmicos (GT).

va fue realizada utilizando los esquemas de Gibson *et al* (1977). Debido a la dificultad de obtener en plaza el vibriostático O/129 se utilizó la capacidad de producir gas de la glucosa como único criterio para separar al género *Aeromonas* del género *Vibrio*, incluyendo así en este último a todas aquellas *Aeromonas* no productoras de gas. A los microorganismos que presentaron luminiscencia se les determinó además, la capacidad de utilizar el D-manitol (Baumann y Schubert, 1984).

Características térmicas de las bacterias

En base a las temperaturas extremas de crecimiento se analizó la diversidad bacteriana utilizando un sistema numérico de dos dígitos inspirado en el trabajo de Griffiths y Lovitt (1980). Los caracteres utilizados para la confección del Tipo Térmico (TT) de cada microorganismo se indican en la Tabla 1. El conjunto de tipos térmicos presentes en cada muestra, expresados en tanto por ciento, configuró el denominado Perfil Térmico (PT) de la misma. Se confeccionó una matriz de similitud entre los distintos perfiles térmicos utilizando el Coeficiente de Asociación de Dice, a partir del cual se construyó un dendrograma mediante la técnica del ligamiento promedio (Crisci y López Armengol, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante la campaña se realizaron 66 estaciones de pesca de las cuales se estudiaron 12 bacteriológicamente, correspondiendo a una zona de alta concentración de merluza y su área perimetral.

Tabla 1. Características utilizadas para la confección numérica de tipo térmico de cada microorganismo.

PRIMER DIGITO		SEGUNDO DIGITO	
1	CRECIMIENTO A 2°C	1	CRECIMIENTO A 35°C
2	" " 25°C	2	" " 40°C
4	" " 30°C	4	" " 45°C

Fueron aisladas y estudiadas 214 cepas (140 de origen intestinal, 38 de tegumento y 36 provenientes de 4 muestras de agua) a las que se les agregó 20, tomadas como referencia, provenientes de 2 estaciones de pesca realizadas durante la campaña H05/83. Las características fisiológicas y taxonómicas de las cepas estudiadas se detallan en la Figura 2 y Tabla 2 respectivamente. Se destaca en general la amplia dominancia de las formas bacilares gram negativas respecto a las cocoideas, y una total ausencia de bacilos gram positivos. Diferencias significativas fueron observadas entre la población bactérica intestinal y la de tegumento. La primera se encontró constituída por un 63,5% de *Photobacterium* spp, 19,9% de *Pseudomonas* spp y un 4,9% de *Vibrio* spp entre los géneros más relevantes; se observó además, entre otras características, una alta proporción de formas luminiscentes (22,8%) y de microorganismos con metabolismo fermentativo de la glucosa (69,2%), y baja densidad de gelatinolíticas.

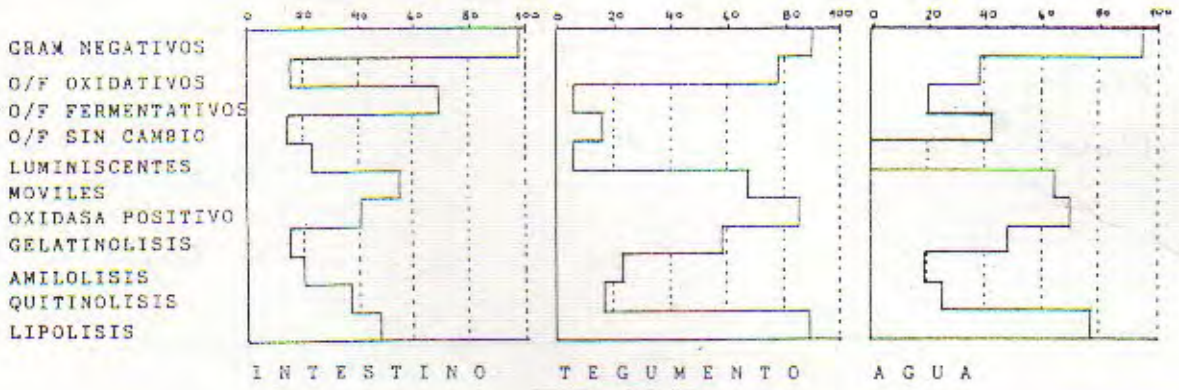

Fig. 2. Características fisiológicas de las bacterias aisladas de merluza *(Merluccius hubbsi)* y de su medio ambiente (frecuencias expresadas en porcentajes).

Tabla 2. Identificación de las bacterias aisladas de merluza *(Merluccius hubbsi)* y de su medio ambiente (en porcentajes)

	MERLUZAS		
	INTESTINO	TEGUMENTO	AGUA
NUMERO DE CEPAS	140	38	36
Pseudomonas spp	19,9	68,2	49,9
Flavobacterium spp	4,2	5,2	11,1
Vibrio spp	4,9		19,4
Photobacterium spp	63,5	5,2	2,7
Acinetobacter spp	2,1	10,5	11,1
Moraxella spp	2,8		
COCOS GRAM POSITIVOS (en racimos, catalasa +)	1,4	10,5	5,5
NO IDENTIFICADAS	0,7		

La flora de tegumento se caracterizó por estar constituída por un 68,4% de *Pseudomonas* spp, una baja proporción de: *Flavobacterium* spp, *Acinetobacter* spp, *Photobacterium* spp y cocos gram positivos, y una total ausencia de *Vibrio* spp. La flora bactérica aislada del agua de mar presentó, a excepción de una densidad de *Vibrio* spp del 18,4%, perfiles taxonómicos y fisiológicos similares a los encontrados en tegumento. Llama la atención la alta densidad de *Vibrio* spp en las muestras de agua. En un estudio realizado por Casellas *et al* (1971) sobre muestras de agua tomadas al sur de los 44°50'S, la densidad de *Vibrios* spp no sobrepasó al 1% de las cepas estudiadas. La diferencia de densidad encontrada podría atribuírse a diferencias ambientales, descartándose, en una primera instancia, un posible aporte de materia fecal en suspensión provenientes de los peces presentes en la zona de pesca, debido a la baja densidad de *Photobacterium* spp encontrada. En el futuro están previstas una serie de campañas estacionales al área estudiada que aportarán, sin dudas, nuevos elementos respecto a la distribución de las bacterias del género *Vibrio* en dicho ambiente. La preponderancia observada de *Photobacterium* spp en intestino respecto a tegumento guardó una relación 12/1; la misma relación fue encontrada por Caría (1981) en la flora bactérica de 19 especies de peces patagónicos; en unos trabajos previos realizados sobre la microflora de merluzas capturadas en la zona nor-patagónica fueron encontradas también relaciones 6/1 (Monticelli y Costagliola, 1983, 1984).

Se estudiaron un total de 26 ejemplares de merluzas, de una talla entre 30 y 50 cm, carentes de contenido estomacal e intestinal particulado, estando las muestras constituídas por la secreción mucosa característica de la pared intestinal.

Los perfiles térmicos de cada una de las muestras estudiadas se detallan en la Tabla 3. El presente estudio centró su atención en tratar de determinar mediante análisis numérico, el posible grado de relación entre los distintos PT hallados. En la Figura 3 se desarrolla el dendograma de las relaciones obtenidas entre los PT de las bacterias intestinales. En él se observan claramente 7 agrupamientos, que denominamos Grupos Térmicos (GT), poseedores de un índice de similitud interno superior a 0,6 (algunos incluso superior a 0,8). En la Figura 1 se ubicaron los distintos GT correspondientes a cada una de las estaciones. En un primer análisis podemos dividir la zona estudiada en dos áreas bien delimitadas: la primera, extensa, caracterizada por la presencia repartida de los GT: A, B, C, E, F y G, y con una temperatura a nivel red superior a los 7°C; mientras que la segunda, ubicada al sudeste, se identificó por la presencia exclusiva del GT: D, y con una temperatura a nivel red inferior a los 7°C. Merece destacarse que el GT: D se encontró presente tanto en las merluzas estudiadas durante la campaña OB03/86 como en las analizadas de la campaña H05/83, el GT: D es psicrotrófico por excelencia (100% de bacterias capaces de crecer a 2°C) y está constituído por más del 80% del TT 30, con una esporádica presencia de los TT 70 y 71. Una amplia dominancia del TT 30 fue observada reiteradamente en la flora intestinal de merluzas capturadas en el sector patagónico, esto indujo la realización de un estudio numérico-comparativo que se encuentra aún en elaboración.

Algunos interrogantes surgen sobre las posibles variaciones de los perfiles térmicos presentes en el intestino y tegumento de cada pez, posible influencia de la dieta, corrientes, etc. que merecen ser analizados en el futuro. Un estudio previo reveló la permanencia de algunos TT en merluzas capturadas en áreas patagónicas de pesca analizadas durante tres años (Monticelli y Costagliola, 1985). Lo visto hasta el momento aporta una serie de indicios que inducen a considerar a un determinado GT, o a una mezcla de ellos, como verdaderas improntas de cada zona.

Desde un punto de vista genérico la flora intestinal se presenta bastante homogénea, no observándose agrupamientos significativos en correspondencia con los distintos GT. Las diferencias genéricas encontradas entre la flora de intestino, tegumento y agua (Figura 2 y Tabla 2) se reflejan también en el análisis numérico de los perfiles térmicos. Como se observa en el dendrograma de la Figura 4, los PT de intestino presentaron una buena asociación entre sí, lo mismo para los PT de tegumento, estando significativamente disociados ambos grupos. Las muestras de agua de mar, a igual que en sus aspectos genéricos, mostraron una estrecha asociación con las muestras de tegumento.

Tabla 3. Perfiles térmicos (PT) de las muestras estudiadas (I: contenido estomacal, T: tegumento, A: agua, M: merluza).

ESTACION		TIPOS TERMICOS (%)								
		00	20	30	60	61	63	67	70	71	73
M—50 a	I			14,3					14,3	71,3	
M—50 b	I						25,0				75,0
M—50	I			50,0	16,6					16,6	16,6
M—50 c	I		25,0	25,0					25,0		25,0
M—51	I		28,6	57,1					14,3		
M—53 a	I			40,0		20,0	20,0		20,0		
M—53	I		33,3	33,3		33,3					
M—55	I		45,4	36,4	9,1		9,1				
M—60 a	I		14,2	14,2							71,4
M—60 b	I		40,0	50,0					10,0		
M—66	I		28,6	28,6			28,6				14,2
M—70 a	I								16,6	83,3	
M—70	I	7,7	15,4	61,5					15,6		
M—84	I			87,5						12,5	
M—83	I			83,3					16,6		
M—80	I			50,0					37,5		12,5
M—79	I		30,0	60,0			10,0				
H05/83	I			76,9						23,1	
M—84	T									83,3	16,6
81	A		28,6			14,3				42,8	14,3
M—80	T		14,3	14,3					14,3	28,6	28,6
M—66 a	T		25,0	50,0					25,0		
60	A		10,0	10,0						50,0	30,0
M—60	T		16,6	16,6	16,6					16,6	33,3

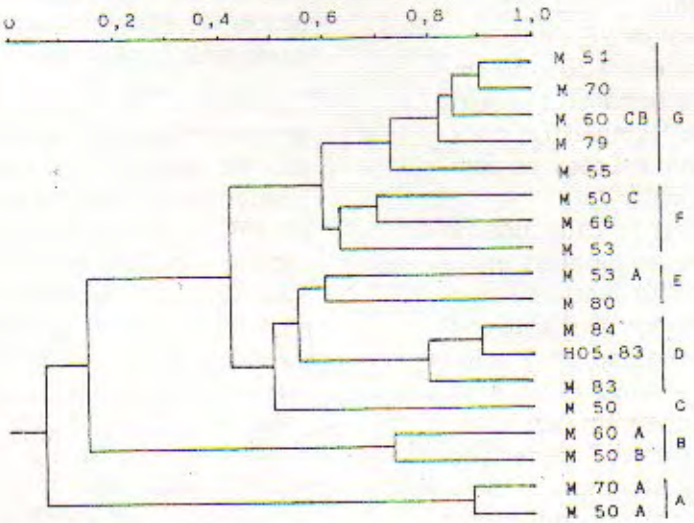

Fig. 3. Dendrograma de las relaciones obtenidas entre los perfiles térmicos (PT) de las bacterias presentes en intestinos de merluza *(Merluccius hubbsi)*.

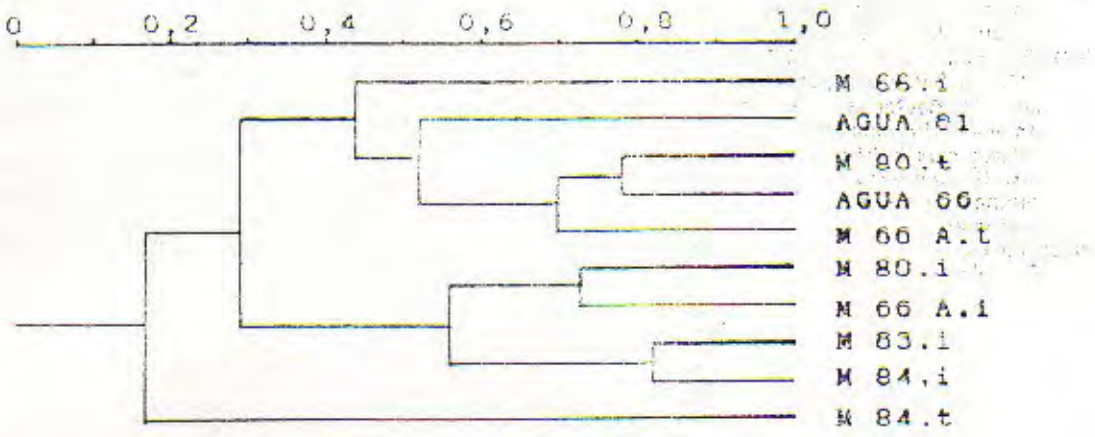

Fig. 4. Dendrograma de las relaciones obtenidas entre los perfiles térmicos (PT) de las bacterias presentes en algunas muestras de agua, tegumento e intestino de *(Merluccius hubbsi)*

CONCLUSIONES

A nivel genérico se observó un patrón de distribución de las bacterias presentes en intestino, tegumento y agua muy similares a lo ya visto en merluza y en otros peces del Mar Argentino. Las Vibrionaceae fueron dominantes en intestino mientras que las *Pseudomonas* spp prevalecieron en tegumento y agua.

El estudio numérico de las asociaciones entre los distintos perfiles térmicos de la flora bactérica intestinal permitió dividir el área estudiada en dos zonas bien definidas: la primera, extensa, caracterizada por la presencia repartida de varios GT y una segunda, reducida, ubicada al sudeste, caracterizada por estar constituída por el 100% de microorganismos psicrotróficos y no menos del 80% del tipo térmico 80, con la presencia esporádica de los tipos térmicos 70 y 71 y conformada por un solo grupo térmico. El tipo térmico 30 fue encontrado dominante, y en algunos casos exclusivo, en estudios previos realizados en merluza patagónica.

Las diferencias genéricas significativas observadas entre la flora de intestino y tegumento se reflejaron también significativamente en el análisis numérico de sus perfiles térmicos.

El empleo de tipos térmicos numéricos, perfiles térmicos, con sus similitudes, conformamiento de grupos térmicos, delimitación de áreas, etc. se perfilan como herramientas a tener en consideración en los estudios ecológico-poblacionales de las bacterias y en las de sus relaciones con la fauna marina y el ambiente.

BIBLIOGRAFIA

BAUMANN, P. y R.H. SCHUBERT. 1984. Family II Vibrionaceae. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. (Ed.N.R.Krieg.) Williams & Wilkins (Baltimore): 516-550.

CARIA, M.A. 1981. Investigaciones de la flora bacteriana en peces marinos y la correlación con su ambiente. Incidencia de *Vibrio/Beneckea* spp en flora bacteriana intestinal. (Campañas IX y XI del B/I *Shinkai Maru*). En: Campañas de Investigación Pesquera realizadas en el Mar Argentino por los B/I *Shinkai Maru* y *Walther Herwig* y el B/P *Marburg* años 1978 y 1979. Resultados de la parte argentina. Contrib. INIDEP, 383: 313-317.

CARIA, M.A. y J.M. CASELLAS. 1971. Bacterias marinas heterotróficas aerobias aisladas del Mar Argentino. I) Distribución y grupos fisiológicos. Rev.Asoc.Arg. de Microbiol., 3 (1-4): 36-45.

CARIA, M.A. y J.M.CASELLAS. 1978. Comunicación preliminar sobre el contenido bacteriano de tegumento e intestino de peces del Mar Argentino. Rev.Mus.Arg.Cs.Nat. "Bernardino Rivadavia". Ser.Hidrob. V (9): 219-228.

CASELLAS, J.M., M.A. CARIA y M.E. GERCHI. 1977. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de cholgas y mejillones en Argentina. Rev.Asoc.Arg. de Microbiol., 9(2): 41-53.

CASELLAS, J.M.; M.E. CARIA y M. MURTAGH. 1971. Bacterias marinas heterotróficas aerobias aisladas del Mar Argentino. II) Taxonomía y nutrición. Rev.Asoc.Arg. de Microbiol. 3(1-4): 46-57.

CRISCI, J.V. y M.E. LOPEZ ARMENGOL. 1981. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numerica. Monografía N° 26. Serie de Biología O.E.A. Prog.Reg. de Desarr.Científ y Tecnol., Washington, D.C.

GEORGALA, D.L. 1958. The bacterial flora of the skin of North Sea cod.Journ. of Gen.Microbiol., 18: 84-91.

GIBSON, D.M.; M.S. HENDRIE, M.C. HUSTON y G. HOBBS. 1977. The identification of some Gram negative heretotrophic aquatic bacteria. En: Aquatic Microbiology, Ed. por F.A. Skinner y J.M. Shewan. Academic Press, New York: 135-159.

GRIFFITHS, A.J. y R. LOVITT. 1980. Use of nu-

merical profiles for studying bacterial diversity. Microbial Ecology, 6:35-43.

MONTICELLI, L.S. y M. COSTAGLIOLA. 1983. Estudio bacteriológico de los peces patagónicos. 1) Bacterias heterotróficas aerobias de polaca *(Micromesistius australis)* y merluza *(Merluccius hubbsi)*. Observaciones preliminares. 9° Congreso Latinoamericano de Microbiología y 12° Congreso Brasileño de Microbiología.

MONTICELLI, L.S. y M. COSTAGLIOLA. 1984. Estudio bacteriológico preliminar de la merluza *(Merluccius hubbsi)* capturada en la Patagonia y su ambiente. VII Jornadas Argentinas de Zoología, Mar del Plata.

MONTICELLI, L.S. y M. COSTAGLIOLA. 1985. Empleo de grupos y perfiles térmicos en estudios ecológicos de las bacterias marinas. Primeros resultados. IV Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires.

RUBY, E.G. y J.G. MORIN. 1979. Luminous enteric bacteria of marine fishes: A study of their distribution, densities and dispersion. Applied and Environmental Microbiology, 38(3): 405-411.