

CEPAS NATIVAS DEL BACTERIONEUSTON MARINO Y SU ACTIVIDAD INHIBITORIA DE BACTERIAS ICTIOPATOGENAS.

Jorge León¹ y Patricio García-Tello²

RESUMEN

En la literatura científica, las bacterias marinas han sido consideradas con frecuencia como productores de sustancias antibacterianas. En este estudio, se investigó el potencial de actividad antibiótica *in vitro* de cepas nativas de bacterioneuston marino aisladas de las pozas intermareales de Montemar, Bahía de Valparaíso, Chile.

Se aislaron 71 cepas neustónicas antagonistas a *Staphylococcus aureus* ATCC 11632. Veinticinco de ellas, productoras de sustancias fuertemente inhibitorias, fueron evaluadas por su antagonismo frente a una colección de 15 bacterias ictiopatógenas. Aplicando métodos clásicos para bacterias marinas, se caracterizaron fenotípicamente orientados a la identificación.

Los resultados de antibiosis indican que la totalidad de las ictiopatógenas en prueba son susceptibles a la actividad inhibitoria de las cepas neustónicas, siendo *V. anguillarum* NCMB 2133, *V. ordalii* 84/2559 y *V. tubiashii* EX1 las más sensibles. Entre las cepas aisladas del neuston se identificaron miembros de los géneros *Vibrio* spp. (28%), *Flavobacterium* spp. (12%), *Alteromonas-Marinomonas* (12%), *Pseudomonas* spp (8%) y *Micrococcus* spp. (4%). Nueve cepas (36%) no fueron identificadas.

Los resultados de actividades inhibitorias frente a ictiopatógenos sugieren que dichas cepas o sus productos pudieran ser útiles en actividades de cultivos intensivos de maricultura de peces, moluscos y crustáceos.

Palabras claves: Antagonismo, bacterioneuston, bacterias ictiopatógenas, maricultura, antibiosis, bacterias marinas.

ABSTRACT

Marine bacteria have been frequently included in the scientific literature as producers substance antibacterial properties. In this study, we investigate the potential activity antibiotic *in vitro* of strains the marine bacterioneuston isolated from rocky litoral pools in Montemar Beach, Bay of Valparaíso, Chile. Were isolated 71 strains antagonic to *Staphylococcus aureus* ATCC 11632. Twentyfive strains producing strongly inhibitory substance were tested against 15 know ichthiopathogenic bacteria. Applying a classic method for marine bacteria, they were carried out phenotypic characterization of bacterioneuston strains accordingly to identified.

Results showed that all fifteen ichthiopathogens strains were inhibited by the neustonic isolates, being *V. anguillarum* NCMB 2133, *V. ordalii* 84/2559 and *V. tubiashii* EX1 the most sensitive. Strains of bacterioneuston were identified as *Vibrio* spp. (28%), *Flavobacterium* spp. (12%), *Alteromonas-Marinomonas* group (12%), *Pseudomonas* spp. (8%) and *Micrococcus* spp. (4%). Nine neustonic isolates did not match our identifications schemes.

Experimental results suggest that this strains or their products could be useful in activities of intensive cultivation of aquaculture fish, mollusks and crustaceans.

Key Words: antagonism, bacterioneuston, ichthiopathogens, aquaculture, antibiosis, marine bacteria.

INTRODUCCION

Los microorganismos marinos (bacterias, cianobacterias, hongos, fitoplancton) y algas mayores, así como algunos invertebrados, han sido considerados como virtuales productores

de metabolitos biológicamente activos (Stierle *et al.* 1988). Por otro lado, numerosos trabajos han revelado la existencia de cepas nativas de bacterias que producen diversos metabolitos secundarios; entre ellas cepas productoras de sustancias antibacterianas

¹ Microbiología Ambiental y Biotecnología - Fac. de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

² Microbiología Marina - Facultad de Ciencias Básicas - Instituto de Biología. Universidad Católica de Valparaíso. Chile.

(Doggett, 1968; Gauthier & Flatau, 1976; Wratten *et al.* 1977; Dopazo *et al.* 1988; Lemos *et al.* 1985, 1991; Marty & Martin, 1992), antivirales (Rinehart *et al.* 1981a; Toranzo *et al.* 1982; Okutani, 1991), antifúngicas (Buck & Meyers, 1965), antiparasitarias (Okami *et al.* 1986; Takahashi *et al.* 1989a), citotóxicas o genotóxicas (Rinehart *et al.* 1981b; Umezawa *et al.* 1983; Okami, 1986; Takahashi *et al.* 1989a, 1989b).

En el ambiente marino, la búsqueda y aislamiento de cepas nativas con actividad antagonista se ha realizado en diversos tipos de muestras, incluyendo agua de mar, sedimentos, fitoplancton, zooplancton, vertebrados e invertebrados (Toranzo *et al.* 1982; Lemos *et al.* 1985; Nair & Simidu, 1987; Dopazo *et al.* 1988).

Uno de los hábitats marinos con mayor densidad poblacional de microorganismos lo constituye la interfase agua-aire. En esta película superficial, que comprende entre 100-1000 μm de espesor, se desarrolla el neuston marino, conformado por una variada y numerosa población de organismos microscópicos, siendo el bacterioneuston el más numeroso (Sieburth, 1979). El bacterioneuston está representado por numerosas especies tanto autóctonas como alóctonas, alcanzando recuentos totales viables del orden de 10^3 - 10^6 UFC/ml (Dahlback *et al.* 1982; Soto *et al.* 1984). Asimismo, se han determinado que tienen capacidades múltiples de biosíntesis de metabolitos secundarios y diversas sustancias intra-extracelulares como pigmentos, bacteriocinas, enzimas (proteasas, lipasas, amilasas, quitinasas, agarasas, etc.) (Kjelleberg & Hakansson 1977).

Este estudio tiene como objetivos centrales, seleccionar cepas antagonistas de bacterioneuston marino y evaluar su actividad antibiótica frente a una colección de bacterias patógenas de peces y moluscos marinos, tales como *Vibrio anguillarum*, *V. tubiashi*, *V. ordalii*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*, especies de *Aeromonas*, *Pseudomonas* y otras; además, establecer pau-

tas generales que puedan servir en la perspectiva de su utilización como agentes de control biológico en la acuicultura marina.

MATERIALES Y METODOS

Lugar de muestreo

Las muestras de la película superficial del agua (interfase agua-aire) fueron recolectadas en las pozas litorales de Montemar, área costera comprendida en la zona de reserva del Instituto de Oceanología de la Universidad de Valparaíso, Bahía de Valparaíso, Chile ($32^{\circ}27'S$, $71^{\circ}33'W$). El lugar es una área rocosa a excepción de pequeños sectores de arena fina. Las pozas se caracterizan por mantener el agua en constante renovación como consecuencia de los movimientos intermareales, con temperatura promedio de $13,4^{\circ}\text{C}$; pH 7,4 y salinidad de 34‰.

Recolección de muestras.

La toma de muestras se realizó a intervalos de 15 días entre mayo a julio de 1995. Se seleccionaron 10 pozas para el muestreo, de las cuales se recolectaron 98 muestras de película superficial agua-aire. Para la toma de muestras se empleó el método de Garret, (1965) con modificaciones del autor. Para ello se utilizó una placa de vidrio de 400 cm^2 ($20 \times 20\text{ cm}$), que fue colocada en posición horizontal y en contacto con la película superficial del agua. Las muestras obtenidas (2 ml) en frascos de tapa rosca (Schott) estériles, fueron inmediatamente transportadas al laboratorio para su procesamiento.

Procesamiento de muestras y aislamiento de cepas.

Para el aislamiento de las cepas marinas se utilizó la técnica de diluciones seriadas al décimo y plaqueo en superficie del agar con modificaciones indicadas en *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Koch, 1994). Las muestras se procesaron utilizando como diluyente agua de mar filtrada y esterilizada. Las muestras (diluidas hasta 10^{-8}) se

homogenizaron en un Vortex Mixer, y fueron pipeteadas alícuotas (0,1 ml) de cada dilución y diseminadas en placas con Agar Marino 2216 (Difco) (MA-2216) y Agar Marino (MA) preparado como sigue (g/l): Bacto-peptona (Oxoid) 4,0; extracto de levadura (Oxoid) 1,0; Bacto-agar (Oxoid) 15,0; agua de mar ñeja 750 ml y agua destilada 250 ml; pH 7,6. Cada dilución fue plaqueada por duplicado e incubada a 20°C por 6 días.

Selección de cepas antagonistas.

Para la selección inicial de las cepas productoras de sustancias antimicrobianas, se siguió el método de doble capa recomendado por Dopazo *et al.* (1988), utilizando como cepa testigo *Staphylococcus aureus* ATCC 11632.

Las placas de aislamiento MA-2216 y MA fueron cubiertas con una segunda capa (3 ml) del medio semisólido Agar Triptosa Soya (TSAs), inoculados con 10 µl de un cultivo de 18 h de la cepa testigo (10^6 cél/ml) e incubados a 35°C por 24 h. El medio TSAs fue preparado en base al Caldo Triptosa Soya (TSB, Oxoid) con 0,6% (p/v) de Bacto-Agar (Oxoid).

Todas las colonias que presentaron halos de inhibición notoria frente al testigo fueron reaisladas y purificadas en el medio MA y repicadas a un cepario para evaluaciones posteriores. Para confirmar la actividad inhibitoria de las cepas neustónicas se siguió el método de Dopazo *et al.* (1988), con modificaciones de los autores. Las cepas reaisladas fueron sembradas (por duplicado) para crear macrocolonias en placas con MA utilizando 10 µl de un cultivo joven. Después de la incubación a 20°C por 5 d, los cultivos fueron sometidos a efectos letales con vapores de cloroformo (45 min); luego, 3 ml del medio TSAs inoculado con *S. aureus* ATCC 11632, fue adicionado sobre las macrocolonias a manera de segunda capa. De manera similar se procedió en las placas duplicadas, empleando como cepa testigo *Vibrio anguillarum* NCMB 2133. Después de un periodo de difusión de 30 min a 20°C, las placas fueron in-

cubadas a 35°C para *S. aureus* y a 30°C para *V. anguillarum* por 24 h.

Pruebas de antibiosis frente a ictiopatógenas.

Para determinar el espectro antimicrobiano del bacterioneuston frente a la colección de especies patógenas de peces y moluscos, se siguió un método modificado de doble-capa, (Westerdahl *et al.*, 1991). Se crearon macrocolonias en el medio MA-2216 por inoculación de 10 l de los cultivos reactivados de las cepas marinas, e incubando a 20°C por 5 días. Al cabo de este tiempo los cultivos fueron tratados con vapores de cloroformo (45 min) y se agregó la segunda capa del TSAs (3ml) inoculada con las cepas ictiopatógenas. Esta segunda capa fue suplementada con NaCl 1,5% (p/v) para las especies de *Vibrio*. Las placas fueron incubadas a 30°C por 28-30 h, con excepción de *V. tubiashii* EX1, para el cual fueron necesarias hasta 72 h. Placas controles sin colonias fueron incluidas en las pruebas para evaluar el posible efecto de cloroformo en el crecimiento de las cepas ictiopatógenas.

Caracterización fenotípica de cepas antagonistas.

Para estudios de caracterización fenotípica se consideraron 25 cepas neustónicas de mayor capacidad inhibitoria de las ictiopatógenas. Además, cinco fueron estudiadas con énfasis por su antagonismo de amplio espectro.

La caracterización fenotípica se realizó mediante métodos convencionales en tubos y placas. Como medio base para todas las pruebas se utilizó el caldo marino (MB) o agar marino (MA), con excepciones que son descritas en el apartado correspondiente. Para algunos ensayos se emplearon como inóculo suspensiones bacterianas preparadas en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,6) y ajustadas a una concentración de 10^6 cél/ml. El cultivo de las cepas se efectuó con una micropipeta calibrada en 10 µl, siendo la temperatura de

incubación de 23°C por 5-6 días con excepciones para algunas pruebas. Para determinar la producción de enzimas extracelulares el período de incubación se prolongó hasta 10 días.

Las cepas en estudio fueron sometidas a pruebas según procedimientos descritos por Baumann *et al.* (1972), Gauthier *et al.* (1975), Austin (1989), Ortigosa *et al.* (1994) y Jensen & Fenical (1995).

- Morfología celular, motilidad y carácter Gram.

La morfología y motilidad celular se estudió mediante observaciones directas al microscopio de contraste de fases (1000X, Nikon). Las muestras se prepararon a partir de un cultivo de 24 h de incubación en MB, y observadas en láminas excavadas. El carácter Gram de las cepas marinas se determinó empleando dos métodos: La técnica clásica de la tinción Gram y el Método de Buck (1982). Para el segundo caso, sobre un portaobjetos limpio se depositó una gota de solución acuosa de hidróxido de potasio (KOH) al 3% (p/v), al cual se le adicionó y se mezcló con una cantidad considerable de masa celular tomada de una macrocolonia. Fueron consideradas como Gram negativas aquellas que provocaron viscosidad en la mezcla, y Gram positivas las que permanecieron invariables.

- Coloración de flagelos.

Las cepas consideradas móviles fueron sometidas a estudios para determinar la disposición flagelar según el método de Mayfield- Innis, (1977).

- Luminiscencia.

La luminiscencia de las cepas fue probada inoculando los cultivos en el medio MA suplementado con glicerol 0,3% (v/v) («seawater complete», SWC), según el procedimiento de Nealson & Hasting (1992). Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad y examinados a diario por 10 días.

- Citocromo-oxidasa.

Esta prueba se efectuó según el método clásico de Kovacs (1956), depositando una fracción de un cultivo fresco sobre una tira de papel filtro (Whatman N° 1) embebida en una solución acuosa al 1% (p/v) de N,N,N',N'-tetrametil-para-fenilendiamina (Sigma). Las cepas citocromo-oxidasa positivas dan lugar a la formación de un compuesto oxidado de color violáceo.

- Catalasa.

La producción de catalasa por las cepas marinas se determinó por la adición de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% (v/v) a un cultivo fresco. La formación inmediata de burbujas efervescentes indican una reacción positiva.

- Metabolismo oxidativo/fermentativo (OF).

La capacidad de las cepas de utilizar la glucosa por vía fermentativa u oxidativa o no utilizarla, fue determinada por el método de Leiffson, adaptado para bacterias marinas por Lemos *et al.* (1985).

- Acumulación de Polihidroxibutirato (PHB).

La capacidad de las cepas de acumular PHB como reserva intracelular se determinó de acuerdo a la metodología de Baumann *et al.* (1972). El medio MB fue suplementado con (NH₄)₂SO₄ al 0,02% (p/v) (Merck) y DL-hidroxibutirato de sodio al 0,4% (p/v) (Merck). Luego de 5 días de incubación las células fueron observadas en un microscopio de contraste de fases. La acumulación de PHB es caracterizado por la presencia de gránulos refráctiles intracelulares.

- Reducción del nitrato.

La prueba de reducción del nitrato a nitrito se efectuó por el método descrito por MacFaddin (1980), adaptado para bacterias marinas.

- Actividades enzimáticas extracelulares.

La producción de enzimas extracelulares por las cepas marinas se determinó mediante la técnica de difusión radial en placas con el sustrato específico. La determinación cualitativa de la actividad enzimática se consideró positiva solamente cuando la zona de reacción se extendió más allá del límite de crecimiento.

a) Hidrólisis de la caseína:

La actividad de la caseinasa se determinó en placas conteniendo el medio MA suplementado con caseína al 1% (p/v) (Difco). Después de la incubación necesaria, la aparición de una zona de aclaramiento alrededor de la colonia en prueba indicó la actividad de la caseinasa microbiana.

b) Hidrólisis de la gelatina:

La producción de la gelatinasa fue determinado por el método de Baumann *et al.* (1972). Las cepas se inocularon en el medio MA suplementado con gelatina microbiológica al 5% (p/v) (Merck). Después de 5 días de incubación, las placas con cultivos fueron bañadas con la solución de bicloruro de mercurio (HgCl_2) (Merck) acidificada. Un halo de aclaramiento alrededor de las colonias demostró la actividad de la gelatinasa.

c) Hidrólisis de la celulosa:

Esta prueba, recomendada para ciertos grupos de bacterias marinas, se realizó por el método de Abhaykumar & Dube (1992). Las cepas fueron inoculadas en el medio MA suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) al 1% (p/v) (Sigma) y fosfato de hierro III (FePO_4) (Fluka) al 0,001% (p/v). Después de una incubación de 10 días se hizo la lectura, considerando como positivas las que formaron una zona de aclaramiento alrededor de las colonias.

d) Hidrólisis del almidón:

La producción de amilasas se determinó según el método clásico de MacFaddin (1980). El medio MA suplementado con almidón soluble al 0,2% (p/v) (Merck), fue inoculado con la cepa en prueba. Luego de 6 días

de incubación, la superficie del medio fue bañada con solución de yoduro de Lugol. Una zona de aclaramiento alrededor de la colonia en prueba indicó actividad positiva de la amilasa.

e) Hidrólisis de quitina y alginato:

La producción de quitinasa y alginasa se determinó según el método de Baumann *et al.* (1972). Las pruebas se efectuaron por el método de doble capa, siendo la capa inferior el medio MA, y la superior MA suplementado con extracto de levadura al 0,25% (p/v) y quitina coloidal al 0,5% (p/v) para el caso de quitinasa; y sustituyendo éste último por alginato de sodio al 2% (p/v) para alginasa. En ambos casos, se crearon macrocolonias con 10 días de incubación. Se consideraron como reacciones positivas la observación de zonas de hidrólisis alrededor de las colonias.

f) Hidrólisis del Tween-80 y lecitina:

La producción de esterases y lecitinasas se determinó sembrando las cepas en el medio MA suplementados con Tween-80 al 1% (v/v) (Sigma) y yema de huevo estéril al 0,5% (v/v), respectivamente. La aparición de un halo opaco en torno a las colonias después de la incubación indicaron la actividad de dichas enzimas.

g) Actividad de la DNAsa:

Para determinar la producción de la DNAsa, las cepas fueron sembradas en el medio DNA (MacFaddin, 1980) adaptado para bacterias marinas con extracto de levadura al 0,2% (p/v) y agua de mar al 50% (v/v). Después de la incubación por 6 días, las placas fueron bañadas con solución de ácido clorhídrico (HCl) 1N y la presencia de un halo claro en torno a las colonias fue considerada como actividad positiva de la enzima.

- Requerimientos de agua de mar y sodio para el crecimiento.

Los requerimientos del agua de mar para el crecimiento de las cepas, fueron determinados según Jensen & Fenical (1994) por comparación del desarrollo de colonias en el medio B1 (2,5 g de peptona; 1,5 g de extracto de

Tabla 1. Población bacteriana del neuston marino en las pozas intermareales de Montemar, Bahía de Valparaíso - Chile.

POZAS (n = 98) ^(a)	N° de cél. viables (UFC/ml)		N° antagonistas aislados (n=71) ^(d)	antagonistas aislados (%)
	Recuento total de heterótrofos ^(b)	Recuento de cél. antagonistas ^(c)		
P 1 (n = 7)	1,6 x 10 ⁶	1,2 x 10 ²	6	8,45
P 2 (n = 14)	3,5 x 10 ⁵	1,7 x 10	11	15,48
P 3 (n = 7)	3,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ²	3	4,22
P 4 (n = 21)	1,6 x 10 ⁵	1,7 x 10	20	28,16
P 5 (n = 7)	1,5 x 10 ⁵	2,6 x 10	4	5,63
P 6 (n = 7)	1,0 x 10 ⁴	4,2 x 10	6	8,48
P 7 (n = 7)	1,3 x 10 ⁵	1,0 x 10	4	5,63
P 8 (n = 7)	3,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ²	5	7,04
P 9 (n = 7)	3,5 x 10 ⁵	4,0 x 10	8	11,25
P 10 (n = 14)	4,0 x 10 ⁴	0,8 x 10	4	5,62

^(a) Número total de muestras.

^(b) Promedio de UFC/ml de muestra.

^(c) Cepa testigo, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632.

^(d) Total de antagonistas aislados por poza.

levadura; 1,5 ml de glicerol, 15 g de agar y 1000 ml de agua de mar) y B1 sustituido por agua desionizada. Las cepas que formaron colonias visibles en el medio con agua de mar, pero no en el medio con agua desionizada, fueron consideradas como que requieren agua de mar para su crecimiento.

Los requerimientos de sodio (Na⁺) fueron determinados según Baumann *et al.* (1972), modificado por Jensen y Fenical (1995) comparando el crecimiento en el medio B1 (sin agar) preparado con agua de mar artificial (ASW) (NaCl 0,4M; MgSO₄·7H₂O 0,1M; KCl 0,02M y CaCl₂·2H₂O 0,02M) y el crecimiento en el medio B1 preparado de la misma forma pero reemplazando la fuente de Na⁺ por concentraciones equimolares de sales de potasio (K⁺). Las cepas que crecieron en B1 preparada con ASW, pero no en B1 preparada con ASW sin Na⁺, fueron consideradas de requerir Na⁺ para su crecimiento.

- Pruebas misceláneas.

Las cepas marinas fueron sometidas a otras pruebas complementarias: crecimiento en el medio MB a temperaturas de 8, 15, 28, 35 y

42°C hasta por 7 días; crecimiento en cloruro de sodio (NaCl) a concentraciones de 0, 3, 5, 7, 10 y 12% (p/v), hasta por 10 días, producción de ureasa, producción del indol y ácido sulfhídrico (H₂S) y sensibilidad al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina fosfato) (Oxoid) a concentraciones de 10 y 150 µg.

Identificación De Cepas Neustónicas Antagonistas. Las cepas en estudio han sido identificadas a nivel de género, empleando básicamente el esquema taxonómico de Oliver (1982), los esquemas de Sawabe *et al.* (1995) y de Jensen & Fenical (1995). Adicionalmente fueron utilizadas las tablas de identificación existentes en el **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9ª Edición (1994), y **The Prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**, 2ª Edición (1992).

Tabla 2. Actividad inhibitoria de 20 cepas de bacterioneuston marino contra 15 bacterias ictiopatógenas.

CEPAS PATOGENAS	CEPAS ANTAGONISTAS																			
	N9.4	N9.5	N10	N11	N12	N13	N15	N33 a	N33 b	N33 c	N33 d	N35 a	N35 b	N36	N37	N53	N58	N64 a	N64 b	N53
<i>Vibrio tubiashii</i> EX1	++ ^(a)	++	++	++	-	(+)	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	++	++	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	+	-	+	+	(+)	(+)	+	++	+	++	+	+	+	+	-	+	-	+++	+++	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 2133	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	-	++	-	+++	+++	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> RP-13	(+)	-	+	+	-	+	(+)	+	+	(+)	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Vibrio anguillarum</i> 775	-	(+)	-	(+)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	++	++	++
<i>Vibrio ordalii</i> NCMB 2167	+++	++	+	++	-	(+)	+	++	++	+++	++	++	++	++	-	+	-	+++	+++	+++
<i>Vibrio ordalii</i> 84/2559	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	++
<i>Vibrio damsela</i> ATCC 33539	(+)	(+)	-	+	-	+	(+)	+	+	(+)	+	++	+	+	(+)	+	-	+++	+++	+++
<i>Vibrio ordalii</i> 14f6	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	-	-	-	-	(+)	-	++	++	+++
<i>Vibrio alginolyticus</i> A32	++	++	-	++	-	-	-	-	+	+	+	(+)	-	+	-	++	(+)	+++	+++	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i> B-35	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Aeromonas salmonicida</i> 67.79	(+)	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+++	+++	+++
<i>Aeromonas sobria</i> P-281	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27859	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	+	++	++	-	(+)	-	++	+	(+)
<i>Yersinia ruckeri</i> PP31	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	+	+	-	-	-	(+)	(+)	-	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 11632 (b)	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++

(a), (+), inhibición débil; +, 4-8 mm zona de inhibición; ++, 8-12 mm zona inhibición; +++, > de 12 mm zona de inhibición; -, no inhibición.
(b); Cepa control.

Tabla 3. Espectro de actividad inhibitoria de 5 cepas seleccionadas de bacterioneuston marino frente a bacterias ictiopatógenas.

Cepas patógenas	Cepas antagonistas				
	N11.6	N22.C	N55.5	N64.1	N1.4a
<i>Vibrio tubiashii</i> EX1	++	+++	+++	++	++
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	+	+++	-	+++	++
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 2133	++	+++	++	+++	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> RP-13	+	+++	-	+	++
<i>Vibrio anguillarum</i> 775	-	+++	-	++	-
<i>Vibrio ordalii</i> NCMB 2167	+++	+++	-	+++	-
<i>Vibrio ordalii</i> 84/2559	+++	++	+++	+++	-
<i>Vibrio damsela</i> ATCC 33539	-	++	-	-	+++
<i>Vibrio ordalii</i> 14/6	-	+++	+	+++	+++
<i>Vibrio alginolyticus</i> A32	++	++	++	+++	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i> B-35	-	+++	-	+	++
<i>Aeromonas salmonicida</i> 67.79	-	+++	-	+++	++
<i>Aeromonas sobria</i> P-281	-	+	-	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	++	-	++	++
<i>Yersinia ruckeri</i> PP-31	-	(+)	(+)	+++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632 ^(b)	++	+++	+++	+++	+++

^(a): (+), inhibición débil; +, 4-8 mm zona de inhibición; ++, 8-12 mm zona de inhibición; +++, > de 12 mm zona de inhibición; -, no inhibición.

^(b): Cepa testigo.

RESULTADOS

Densidad poblacional del bacterioneuston marino.

Los resultados del Recuento Total de Heterótrofos Viabiles (RTHV) y el recuento de cepas neustónicas antagonistas se presentan en la Tabla I.

De un total de 98 muestras de película superficial agua-aire, se lograron aislar 71 cepas antagonistas a *Staphylococcus aureus* ATCC 11632. Los heterótrofos viables oscilan entre $1,0 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^6$ UFC/ml, mientras que los antagonistas fluctúan entre $0,8 \times$

10 a $1,5 \times 10^2$ UFC/ml. El mayor número de cepas con actividad antagonista fue aislado de la poza 4 (P4) (n=21) con un total de 20 cepas (28,16%).

Existe cierta proporcionalidad entre el número total de antagonistas aislados (71) y el número total de muestras analizadas (98), siendo la relación de 0,72 antagonistas por muestra.

Pruebas de antibiosis frente a ictiopatógenas.

Las actividades inhibitorias de las cepas seleccionadas variaron desde simples halos de inhibición de escasos mm hasta halos de 15 mm de diámetro.

Tabla 4. Características fenotípicas de 20 cepas de bacterioneuston productoras de sustancias antimicrobianas.

CEPAS ANTAGONISTAS

PRUEBAS	CEPAS ANTAGONISTAS																						
	N9a	N9b	N10	N11	N12	N13	N15	N33	N33	N33	N33	N33	N33	N35	N35	N36	N37	N53	N58	N64	N64	N53	
								a	b	c	d	a	b	a	b					a	b		
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Luminiscencia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metab. OF (Gluc)	F	F	F	F	O	O	K	F	F	F	F	F	F	F	F	(K)	(O)	F	(O)	O	O	O	F
Metab. Gluc.(A/G)	(A)	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A/G	A	A	A	A	A	A/G	(A)	K	K	K	(A)
Hidrólisis: gelatina	+	+	+	+	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celulosa	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quitina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alginato	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween-80	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
Crecim. NaCl 0%	+	+	+	+	(+)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	(+)	-	-	+	+	-	-	-	+
5%	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-
Crecim. McConkey	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecim. TCBS	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensib. a O/129	R	R	PS	R	PS	S	S	S	PS														
Indol.	-	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crec. microaerófilo	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, positivo; -, negativo; (+), reacción débil; F, metabolismo fermentativo; O, metabolismo oxidativo; A, acidez; G, gas; R, resistente; S, sensible; PS, parcialmente sensible; K, reacción alcalina.

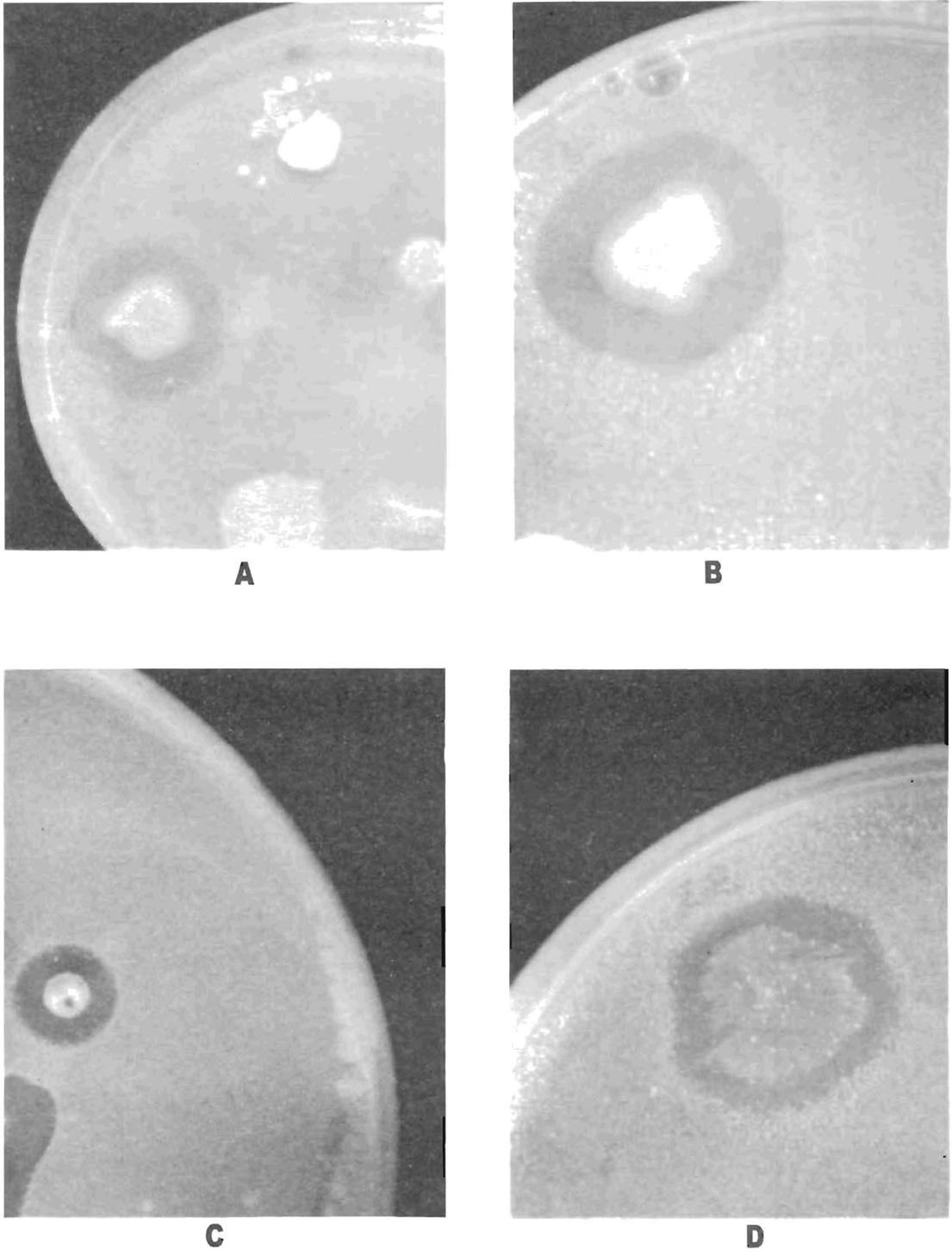
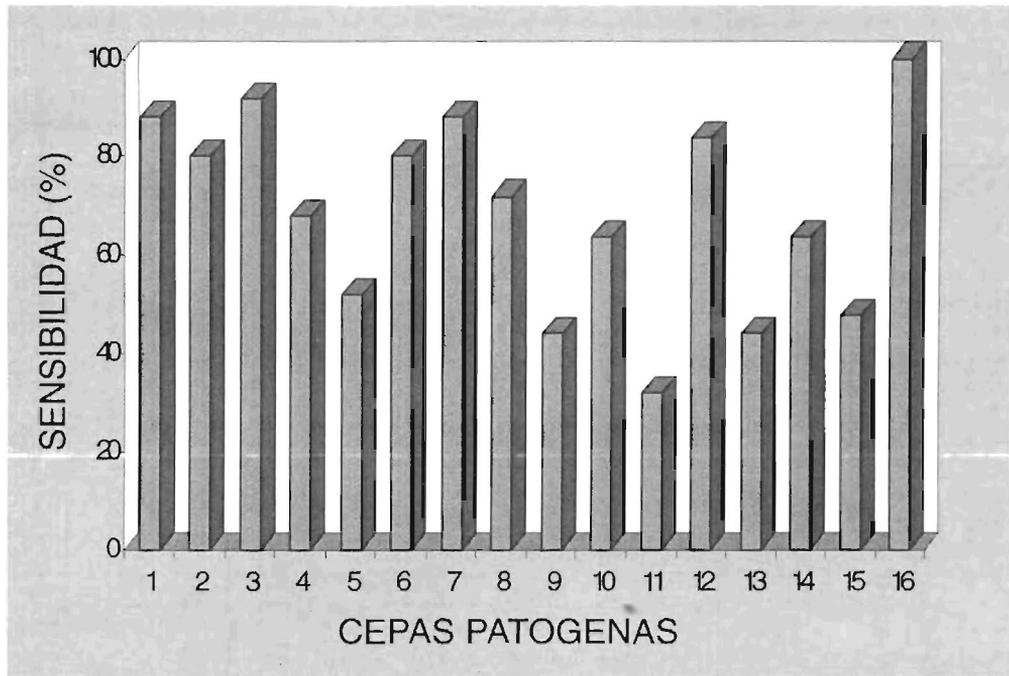


Fig. 1 Características de colonia y actividades inhibitorias de cepas neustónicas, **A:** N11.6 (testigo: *V. alginolyticus* A/32); **B:** N22.C (testigo: *V. anguillarum* NCMB 2133); **C:** N55.5 (testigo: *V. ordalli* 14/6) y **D:** N64.1 (testigo: *V. anguillarum* 775).



1: *V. tubiashii* EX1

2: *V. anguillarum* ATCC 19264

3: *V. anguillarum* NCMB 2133

4: *V. anguillarum* RP-13

5: *V. anguillarum* 775

6: *V. ordalii* NCMB 2167

7: *V. ordalii* 84/2559

8: *V. damsela* ATCC 33539

9: *V. ordalii* 14/6

10: *V. alginolyticus* A32

11: *A. hydrophila* B-35

12: *A. salmonicida* 67.79

13: *A. sobria* P-281

14: *P. aeruginosa* ATCC 27853

15: *Y. ruckeri* PP-31

16: *S. aureus* ATCC 11632 (control)

Fig. 2 Porcentaje de sensibilidad de cepas ictiopatógenas frente a bacterioneuston inhibitorio.

Según las pruebas de antagonismo efectuadas en este estudio, la totalidad de las 15 bacterias ictiopatógenas resultaron susceptibles frente a los aislados neustónicos (Tablas 2 y 3, y Fig. 1). El espectro de actividad inhibitoria se manifiesta de manera similar frente a todos los ictiopatógenos.

Vibrio anguillarum NCMB 2133 resultó ser el más sensible, siendo inhibido por 92% de las cepas neustónicas; mientras que *V. tubiashii* EX1 y *V. ordalii* 84/2559 fueron sensibles a 88% de las cepas en estudio; en tanto, que *V. ordalii* NCMB 2167 fue sensible a 80%

de aislados neustónicos (Fig. 2). Entre los patógenos en prueba, *A. hydrophila* B-35 y *A. sobria* P-281 resultaron ser menos sensibles. Respecto a patógenos de origen no marino (*A. salmonicida* 67.79, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Yersinia ruckeri* PP-31) las sensibilidades fueron variables; así, *P. aeruginosa* (considerada como resistente a antibióticos comunes) resultó inhibida por 64% cepas neustónicas (Fig. 2).

Entre otros aislados neustónicos (Tabla 3), las cepas N64.1 y N22.C exhibieron mayor actividad inhibitoria, siendo efectivos contra

Tabla 5. Características taxonómicas de 5 cepas de bacterioneuston marino seleccionadas por su amplio espectro inhibitorio frente a 15 bacterias ictiopatógenas.

CARACTERES	CEPAS ANTAGONISTAS				
	N11.6	N22.C	N55.5	N64.1	N1.4a
Gram	-	-	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	
Luminiscencia	-	-	-	-	-
Pigmento	-	-	anaranjado	amarillo-ocre	-
Presencia de PHB	-	-	-	-	+
Motilidad	+	+	-	-	+
Posición de flagelos	polar	polar	-	-	polar
Metabol. OF (Gluc.)	F	O	O	- (K)	F
Metabol. Gluc. (A/G)	A/-	(A)/-	(A)/-	-/- (K)	A/-
Reduc. NO ₃ a NO ₂	+	-	-	-	+
Hidrol. de Gelatina	+	+	(+)	+	+
Caseína	+	+	-	+	+
Celulosa	-	-	-	-	-
Almidón	-	+	(+)	+	+
Quitina	-	-	-	-	-
Alginato	-	-	-	-	-
Tween-80	+	+	+	+	+
Lecitina	-	+	-	(+)	+
DNA	+	+	+	(+)	+
Urea	+	-	-	(+)	(+)
Requerimiento agua de mar. no		si	no	si	si
Requerimiento de sodio (Na ⁺)		si	si	si	si
Crecim. NaCl 0%	+	-	+	-	-
3%	+	+	+	+	+
5%	-	+	(+)	(+)	+
7%	-	+	-	-	+
10%	-	(+)	-	-	+
Crecim. a 8°C	-	-	-	-	-
28°C	+	+	+	+	(+)
35°C	+	+	+	-	-
42°C	+	-	+	-	-
Sensibilidad a O/129	R	R	(S)	S	S
Crecim. Mc Conkey	NC	NC	NC	NC	C
Crecim. en TCBS	NC	NC	NC	NC	NC
Produc. Indol/H ₂ S	-/-	-/-	-/-	(+)/-	-/-
Anaerobio facultativo	+	-	-	-	+

+; reacción positiva; -, reacción negativa; (), reacción débil; F, fermentativo; O, oxidativo; K, alcalinidad; A, acidez; R, resistentes; S, sensible; C, crecimiento; NC, no crecimiento.

el 93,75 y 100% de las ictiopatógenas respectivamente.

Caracterización fenotípica del bacterioneuston.

Los aislados neustónicos con excepción de las pigmentadas, mostraron homogeneidad de características fenotípicas (Tablas 4 y 5).

De un total de 25 cepas (100%), 24 (96%)

presentaron la forma típica bacilar o cocabacilar Gram negativo, rectos y/o curvos, simples o en pares. Después de 2 a 3 días de incubación, en algunas cepas se observó un marcado pleomorfismo e incremento de las formas filamentosas. Una sola cepa (N55.5), resultó ser coco Gram positivo.

En cuanto a motilidad, 21 aislados (84%),

resultaron ser móviles por flagelos en cultivos líquidos, siendo muy evidentes dentro de las 24 h de incubación. Solamente en 4 casos (16%) (N64a, N64, N64.1 y N55.5), no mostraron motilidad.

De las 25 cepas investigadas, 8 (32%) resultaron ser aerobios estrictos, en tanto que el resto (68%) se comportaron como anaerobios facultativos. En el medio MA suplementado con 1% de almidón, se obtuvieron colonias no pigmentadas, generalmente circulares (2-3 mm de diámetro), convexas, opacas, superficie lisa, brillante, borde entero y consistencia mucoide; así como las cepas pigmentadas N64a, N64b, N64.1 y N55.5. Las cepas N11.6 y N22.C, presentaron características morfológicas y fisiológicas similares entre sí (Fig. 1A y 1B), siendo las características diferenciales para N22.C, el tipo de metabolismo oxidativo de la glucosa y requerimientos de oxígeno y agua de mar para crecer (Tabla 5). La cepa N55.5 dio colonias con pigmento anaranjado (no difusible), forma circular de 2-3 mm de diámetro, elevada, borde entero, brillante y de consistencia mucoide, (Fig. 1C), en tanto, N64 y sus variantes presentaron colonias de 3 - 5 mm de diámetro con pigmento (no difusible) de color amarillo-ocre, forma irregular, escasa elevación, bordes rizoides, superficie rugosa y de consistencia ligosa, (Fig. 1D).

La cepa N1.4a fue una excepción; dio colonias no pigmentadas, irregulares, grandes de 4 a 5 mm de diámetro, bordes ligeramente lobulados, opacas, de consistencia viscosa y muy invasivas. El crecimiento en los medios tanto líquidos como sólidos, fue dentro de las 24 h a 20°C de incubación.

Todas las cepas resultaron positivas a la reacción de la oxidasa y catalasa. Ninguna mostró luminiscencia.

Frente a la prueba OF para glucosa, el comportamiento de los aislados fue variable; resultando 14 cepas (56%) con metabolismo fermentativo. 8 (32%) con metabolismo oxidativo y 3 cepas (12%) fueron incapaces de utilizar glucosa. Las cepas metabolizaron

glucosa con producción de acidez pero sin gas, con excepción de N35.2 que mostró producir gas en pequeña proporción.

El porcentaje de cepas productoras de enzimas extracelulares fue tal como sigue: gelatinasa y caseinasa (96%), DNAsa (92%), tween-esterasa (80%), alginasa (36%), amilasa (32%), ureasa (24%), celulasa (12%), y quitinasa (4%).

Las pruebas de requerimiento de agua de mar y requerimientos de Na^+ para el crecimiento bacteriano (claves para considerar la originalidad de cepas marinas) efectuadas con 5 cepas seleccionadas, muestran que N22.C, N64.1 y N1.4a requieren de agua de mar para crecer, en tanto que todas requieren del ión Na^+ , (Tabla 5).

Otras características fenotípicas son indicadas en las Tablas 4 y 5.

De acuerdo a los esquemas de identificación para bacterias marinas y los manuales taxonómicos citados anteriormente, se identificaron siete miembros del género *Vibrio* spp. (28%), tres de *Flavobacterium* spp. (12%), tres del grupo *Alteromonas-Marinomonas* (12%), dos de *Pseudomonas* spp (8%) y uno de *Micrococcus* spp. (4%). Nueve cepas neustónicas (36%) no fueron identificadas.

DISCUSION

La flora bacteriana del neuston ha sido estudiada por numerosos investigadores. la mayoría de ellos se han referido a investigaciones taxonómicas y ecológicas. Por otra parte, las bacterias marinas con propiedades antagonistas también han sido investigadas ampliamente, habiéndose estudiado cepas inhibitorias aisladas de cuerpos de agua, sedimentos, plancton, invertebrados, algas y organismos mayores. En cambio, el bacterioneuston no se ha estudiado en este sentido.

Un análisis del recuento total de heterótrofos viables del bacterioneuston marino efectuados en el presente trabajo, revela una densidad poblacional que oscila entre $1,0 \times 10^4$ y $1,6 \times 10^6$ UFC/ml. Resultados simila-

res fueron obtenidos por Sieburth, (1979) y Soto *et al.* (1984). En este trabajo se consideró la frecuencia porcentual de bacterioneuston antagonista aislados en cada poza. Dichos resultados dieron una información preliminar de la población existente en las pozas, además sirvió de parámetro referencial para investigaciones posteriores.

En relación a criterios de aislamiento de cepas con actividad antimicrobiana a partir de ambientes marinos, la mayoría de investigadores (Burkholder *et al.* 1966; Gauthier *et al.* 1975; Gauthier & Flatau, 1976; Lemos *et al.* 1985; Nair & Simidu, 1987; Dopazo *et al.* 1988; Fabregas *et al.* 1991; Westerdahl *et al.* 1991; Riquelme *et al.* 1996), utilizaron un «pool» de cepas aisladas en forma aleatoria. En cambio, en el presente trabajo, la selección inicial se realizó a partir de las placas de aislamiento mediante la adición de la cepa testigo. La cantidad de cepas antagonistas recuperadas (71), reflejan que el criterio de selección es adecuado y puede ser un método alternativo en la recuperación de mayor número de cepas.

Respecto a las pruebas de antibiosis frente a la colección de 15 cepas ictiopatógenas (Tablas 2 y 3), los resultados son concordantes con los de otros autores (Lemos *et al.* 1985; Nair & Simidu, 1987; Dopazo *et al.* 1988; Westerdahl *et al.* 1991; Riquelme *et al.* 1996), con la diferencia de que ninguna de las cepas ensayadas por tales investigadores fueron del neuston, y las cepas testigo no necesariamente fueron ictiopatógenas. Respecto a las cepas testigo de laboratorio, se ha establecido en general que las Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas; por lo que se ha convenido en utilizar en este trabajo a *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 como cepa referencial en todas las pruebas de actividad inhibitoria. Otros autores (Gauthier, 1976a, b; Gauthier & Flatau, 1976a; Lemos *et al.* 1985; Nair & Simidu, 1987; Barja *et al.* 1989) también utilizaron Gram positivas como cepas testigo, particularmente el género *Staphylococcus*.

Los aislados neustónicos mostraron fuerte actividad inhibitoria, no solamente contra los patógenos de peces y moluscos, también lo hicieron frente a cepas no marinas como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 65386 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (datos no presentados en el presente trabajo). Esta actividad inhibitoria fue también demostrada por otros autores (Lemos *et al.* 1985; Nair & Simidu, 1987; Fábregas *et al.* 1991), quienes evaluaron no solamente antibiosis frente a cepas ambientales, también lo hicieron frente a patógenos humanos. La amplitud de la actividad inhibitoria de las cepas neustónicas evaluadas en este trabajo, nos sugieren que las cepas marinas podrían ser productoras de sustancias similares a antibióticos, más que bacteriocinas.

A través de este trabajo, también se ha observado la variación de la capacidad de producción de sustancias inhibitorias. Mientras las cepas han sido mantenidas en estado de crecimiento activo a 20°C de incubación y provistas de nutrientes adecuados, la actividad inhibitoria fue siempre la misma; pero, en subcultivos reactivados después de incubaciones prolongadas a 8°C (como cepario) se observó una marcada disminución de actividad y por el contrario, un incremento del carácter autoinhibitorio. Este fenómeno fue también observado por otros autores (Gauthier *et al.* 1975; Gauthier & Flatau, 1976; Barja *et al.* 1979; Lemos *et al.* 1985). El fenómeno de actividad antibiótica y autotoxicidad fue evaluado en *Alteromonas luteo-violaceus* por Gauthier & Flatau (1976), quienes consideraron que la presencia de sustancias polianiónicas (difusibles hacia el medio externo) serían las responsables de la actividad inhibitoria, mientras que otra sustancia brominada (poco difusible) que se mantiene asociada a la célula, sería la responsable de la autotoxicidad (mediante una modificación de la respiración celular). Por otro lado, desde la óptica ecológica, el fenómeno de autoinhibición consistiría en un mecanismo

de autorregulación poblacional. Estudios posteriores serían necesarios para aclarar este fenómeno.

En las pruebas de caracterización fenotípica, la gran mayoría (96%) resultó tener características morfológicas y fisiológicas propias de bacterias marinas. Estas características de las bacterias del neuston son también descritas por otros autores (Sieburth, 1979; Dahlback *et al.* 1982; Hermansson *et al.* 1978). Las variantes pleomórficas o filamentosas fueron observadas con frecuencia en los medios de cultivo líquido. De la misma forma, se observó con frecuencia la disminución de motilidad y el comportamiento "Gram variable" a medida que se prolongó la edad de los cultivos. Estas características de bacterias marinas también han sido observadas de manera similar por Baumann *et al.* (1972), Gauthier *et al.* (1975) y Austin (1989).

A diferencia de otros autores (Gauthier *et al.* 1975; Gauthier & Flatau, 1976; Lemos *et al.* 1985; Nair & Simidu, 1987; Dopazo *et al.* 1988; Fábregas *et al.* 1991; Westerdahl *et al.* 1991) que seleccionaron preferencialmente colonias pigmentadas en la búsqueda de cepas inhibitorias, en el presente trabajo el criterio de selección se aplicó sin considerar morfología colonial, y como resultado de ello las formas no pigmentadas representaron el 84% del total; sin embargo, las pigmentadas (16%) presentaron mayor actividad antibacteriana.

Las cepas neustónicas identificadas en el presente estudio, corresponden a otras similares de ambientes marinos. El género *Vibrio*, que representa el mayor número de antagonistas aislados, fue también estudiado por Buck & Meyer's (1965) y Doggett (1968). Tres cepas neustónicas, entre ellas N22.C, muy importante por su actividad inhibitoria, fueron incluidas en el grupo de *Alteromonas-Marinomonas*. Al respecto, *Alteromonas* fue aislada en numerosas ocasiones como productoras de una serie de metabolitos secundarios, entre ellos sustancias antibacterianas. En tal sentido, nuestras *Alteromonas* aisladas en este trabajo reafirman los hallazgos de otros auto-

res (Gauthier, 1976a, 1976b; Gauthier & Flatau 1976; Lemos *et al.* 1985; Shigemori *et al.* 1992; Riquelme *et al.* 1996). Un cuarto grupo, conformado por tres cepas cuyas características fenotípicas son compatibles con las descritas por Holmes *et al.* (1984), fueron atribuidas al género *Flavobacterium*. Estas cepas, aisladas en el mismo lugar de muestreo, es muy probable que pertenezcan a la misma especie, debido a sus características compartidas entre sí. El género *Flavobacterium* también fue reportado como productor de sustancias inhibitorias por Okami (1986). Dos cepas fueron identificadas como *Pseudomonas*, resultando concordantes con los trabajos de Buck & Meyers (1965), Burkholder *et al.* (1966), Lemos *et al.* (1985), Nair & Simidu (1987) y Okutani & Tandavanitj (1991). Finalmente, la cepa N55.5, que resultó ser la única Gram positiva, fue incluida en el género *Micrococcus* y su hallazgo como antagonista es relativamente novedoso, ya que solamente es descrita por Stierle *et al.* (1988).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En base a los antecedentes reunidos y los resultados experimentales, podemos afirmar que las bacterias de origen marino con capacidad de producir sustancias antibacterianas tienen amplia distribución en el ecosistema marino, incluyendo la película de interfase agua-aire. Por otro lado, el bacterioneuston marino incluye entre sus miembros a cepas con capacidad de biosíntesis de sustancias con amplio espectro inhibitorio y que actúan con gran eficacia frente a bacterias ictiopatógenas. Igualmente, el bacterioneuston marino reúne todas las características fenotípicas de otras bacterias marinas, lo cual corrobora la condición de cepas nativas, conformadas no solamente por bacterias Gram negativas y comunes de otros hábitats, sino también por cepas antagonistas poco conocidas como *Flavobacterium* y *Micrococcus*, géneros aislados y evaluados en el presente trabajo.

Las bacterias marinas han sido reconoci-

- LEE JV. 1975. Taxonomic position and seasonal variations in marine neritic environment of some Gram negative antibiotic-producing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 87: 211-218.
- GAUTHIER MJ. 1976a. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 459-66.
- GAUTHIER MJ. 1976b. Modification of bacterial respiration by a polyanionic antibiotic produced by a marine *Alteromonas*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 361-66.
- GAUTHIER MJ & FLATAU GN. 1976. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Can. J. Microbiol.* 22: 1612-19.
- HERMANSSON M, JONES GW & KJELLEBERG S. 1978. Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation and plasmids in bacteria of marine air-water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2338-2342.
- HOLMES B, OWEN R & MACMESKIN T. 1984. Genus *Flavobacterium*, pp 353, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1 Williams & Wilkins. Baltimore.
- JENSEN PR, & FENICAL W. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 559-84
- JENSEN PR, & FENICAL W. 1995. The relative abundance and seawater requirements of Gram-positive bacteria in near-shore tropical marine samples. *Microb. Ecol.* 29: 249-257.
- KJELLEBERG S & HAKANSSON N. 1977. Distribution of lipolytic, proteolytic and amylolytic marine bacteria between the lipid film and the subsurface water. *Mar. Biol.* 39: 103-109.
- KOCH AL. 1994. Growth measurement. In Gerhardt P, Murray RGE, Willis A, Wood WA, Noel R, Krieg NR, eds. *Methods for general and molecular bacteriology*. Am. Society for Microbiology. Washington, DC. pp. 254-57
- KOVACS N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reactions. *Nature* 178: 703
- LEMOS ML, TORANZO AE & BARJA JL. 1985. Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1541-1543.
- LEMOS ML, DOPAZO CP, TORANZO AE & Barja JL. 1991. Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 228-32.
- LEMOS ML, TORANZO AE & BARJA JL. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal sea-weeds. *Microb. Ecol.* 11: 149-63.
- MACFADDIN JF. 1980. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica*. Ed. Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires
- MARTY P & MARTIN Y. 1992. Aerobic heterotrophic bacteria associated with some Mediterranean coastal benthic invertebrates: Characterization of strains, exoenzyme and antibiotic production. *Mar Life.* 1(1): 1-8.
- MAYFIELD CI & INNIS WF. 1977. A rapid simple method for staining bacterial flagella. *Can. J. Microbiol.* 23: 1311-1313
- NAIR S & SIMIDU U. 1987. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2957-62
- NEALSON K & HASTINGS W. 1992. The luminous bacteria, pp. 625, In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K, eds. *The Prokaryotes. a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application*. 2nd vol 1. Springer Verlag
- OKAMI Y. 1986. Marine microorganism as a source of bioactive agents. *Microb. Ecol.* 12: 67-78
- OKUTANI K & TANDAVANITJ S. 1991. Isolation and characterization of a fucosamine-containing polysaccharide from a marine strain of *Pseudomonas*. *Nipp. Suis. Gakkaishi* 57: 2151-56
- OLIVER JD. 1982. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-Sea Res.* 29: 795-98
- ORTIGOSA M, GARAY E & PUJALTI M-J. 1994. Numerical taxonomy of aerobic, Gram-negative bacteria associated with oysters and surrounding seawater of the

- Mediterranean coast. System. Appl. Microbiol. 17: 589-600
- RINEHART KL, GLOER JB, HUGHES RG, RENIS HE & MC GOVREN JP. 1981a. Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. Science 212: 933-35
- RIQUELME C, HAYASHIDA G, ARAYA R, UCHIDA A, SATOMI M & ISHIDA Y. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. J. Shellfish Research 15: 369-374.
- SAWABE T, ODA Y, SHIOMI Y & EZURA Y. 1995. Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. Microb. Ecol. 30: 193-202.
- SHIGEMORI H, BAE M-A, YAZAWA K, SAZAKI T & KOBAYASHI J. 1992. Alteramide A, a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*. J. Org. Chem. 57: 4317-20.
- SIEBURTH JM. 1979. Sea Microbes. New York: Oxford Univ. Press. 491 pp.
- SOTO Y, ROBESON J y GARCÍA-TELLO P. 1984. Incidencia y características metabólicas de bacterias de superficie hidrofóbica presentes en el neuston de pozas litorales. Rev. Biol. Mar. Valparaíso, 20(2): 127-137.
- STIERLE AC, CARDELLINA JH & SINGLETON FL. 1988. A marine *Micrococcus* produce metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. Experientia 44: 1021
- TORANZO AE, BARJA JL & HETRICK FM. 1982. Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. Can. J. Microbiol. 28: 231-38.
- WESTERDAHL A, OLSSON J, KJELLEBERG S & CONWAY P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2223-28.

✱