

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GENERO *Vibrio*,
AISLADOS DEL TRACTO DIGESTIVO DEL LENGUADO *Etropus ectenes*.**

Carmen Ruíz¹

cruiz@imarpe.gob.pe
Unidad de Investigaciones en Acuicultura, Instituto del Mar del Perú
Apartado 22, Chuchito, Callao

RESUMEN.-

Se realizó la evaluación de la flora bacteriana presente en el estómago del Lenguado. El aislamiento microbiológico se realizó de dos formas: La primera, usando el método básico convencional de microbiología, enriquecimiento primario y usando medios selectivos para la propagación de microorganismos del género *Vibrio*, posteriormente realizamos las pruebas complementarias que fueron la identificación bioquímica que consistió en distintos test químicos aplicados a los medios biológicos, que al conocer su reacción, nos permitió identificar los distintos microorganismos presentes. La segunda forma, se realizó utilizando las galerías de los test rápidos comerciales, Kit API20 NE, para la identificación bioquímica de las bacterias *Vibrio* presente. Para los resultados se utilizó el BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1994) y un sistema automatizado para el kit rápido que se obtuvieron con ayuda del programa informático API WEB, que son reportados de acuerdo a los criterios establecidos por los fabricantes.

Se identificó 14 cepas microbianas; 12 pertenecen al género *Vibrio alginolyticus* y dos cepas presuntivas 01 perteneciente a la especie *Vibrio parahaemolyticus* y una 01 al género *Pseudomona*, que posteriormente, se volverán a evaluar para su identificación final. Actualmente se conservan las cepas bacterianas con un crioprotector y congeladas a -80°C para su posterior uso.

Palabras Claves: Bacterias *Vibrio*, identificación bioquímica, medios biológicos.

ABSTRACT.-

We have performed the evaluation of the bacterial flora present in the stomach of Sole. Microbiological isolation was carried out in two ways: first by the conventional basic method of microbiology, with primary enrichment and the use of selective media for the propagation of microorganisms of the genus

¹ Bióloga Carmen Milagros Ruiz Huamán. Con Maestría en Biotecnología y Doctorado en Gestión Ambiental y Evaluación de Impacto Ambiental. Experiencia en Producción de (Microalgas) y análisis de: hidrocarburos, sulfuros en agua de mar, toxicológico e inmunológico del residual de Cloranfenicol en langostinos e identificación de Biotoxinas Marinas y Biología Molecular de la Floración Algal Nocivas, como también en prospección, diseño, ejecución, monitoreo, evaluación y seguimiento en temas relacionados con el mar. Experiencia en consultorías externas en elaboración y formulación de Proyectos de Desarrollo Socioeconómico en comunidades nativas y cadena productiva en Acuicultura.

Vibrio, further test of biochemical identification were conducted. Which consisted in chemical test applied to various biological media, so that their reaction , allowed us to identify different microorganisms. The second method was performed using the API20 NE Kit commercial rapid test, for biochemical identification of *Vibrio sp.* To obtain the results the bacteria identification was done following the BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1994), and the automated system fast kit using the WEB API software, which are reported according to the criteria set by automakers.

We have identified 14 microbial strains; 12 belonging to the genus *Vibrio alginolyticus*, and two possible strains, one belonging to the specie *Vibrio parahaemolyticus* and the other one to the genus *Pseudomona sp.* Later, we will complete the final identification.

Key words: *Vibrios*, biochemical identification, biological media

1. INTRODUCCIÓN.-

La diversificación de la acuicultura es un imperativo para muchos países, tanto por el comportamiento de los mercados internacionales, los cuales obligan a aumentar el espectro de ofertas a fin de evitar la dependencia de tan sólo un número limitado de especies, como por la ocurrencia reciente de epizootias en importantes rubros acuícolas de amplias regiones continentales, que han afectado gravemente los cultivos y han reducido en forma significativa la producción.

En tal sentido, una de las principales dificultades que existe en todo cultivo comercial de organismos marinos es la aparición de enfermedades infecciosas como resultado de la incidencia de bacterias, hongos y virus frecuentemente asociados con el aumento en las densidades de cultivo y rápido desarrollo de la acuicultura con deficiencias en los métodos de manejo, calidad de agua y deficiente valor nutricional del alimento.

En el pasado, ante la aparición de cualquier síntoma de enfermedad, se recurrió al uso incontrolado de agentes químicos como los antibióticos, cuyo espectro de acción es obviamente limitado para la prevención y control de enfermedades, SUBASINGHE (1997), además, causan efectos adversos como la aparición de cepas bacterianas multiresistentes que incluso pueden llegar a afectar la salud del consumidor, SMITH et al. (1994). Por otro lado, en los cultivos de peces planos, la vibriosis ha llegado a ser la enfermedad económicamente más importante, afectando un gran número de especies TORANZO & BARJA (1999), demostrando así, que la mayoría de las patologías en estos peces, ocurre por la penetración de los agentes infecciosos a través de la piel, no descartándose la posibilidad de infecciones través de las branquias y del tracto intestinal, MASURA et al (1989). La vibriosis es una enfermedad septicémica, causada por diversas bacterias del género *Vibrio*, el cual es de ocurrencia universal en ambientes Estuarino Marino, y pueden ser facultativamente patógenos para muchas especies de peces e invertebrados. COLWELL (1984).

Hay 8 especies reportada como patógenas de peces: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. ordalli*, *V. salmonicida* y *V. vulnificus*. AUSTIN & AUSTIN (1987). De éstos, *V. anguillarum* es el agente etiológico más importante de la vibriosis.

La especie *V. parahaemolyticus* no es considerada por el momento como patógena de peces hasta no tener evidencias fundamentales sobre el particular. AUSTIN & AUSTIN (1987).

2. MATERIAL Y MÉTODOS.-

2.1. Aislamiento de bacterias.-

Se trabajó con el lenguado *Etropus ectenes*, en estrictas condiciones de asepsia. El animal previamente sacrificado se le extrajo el tracto digestivo (estómago) el cual fue triturado en una placa petri estéril y se le agregó 5 ml de solución salina al 0,85%.

Aislamiento de Vibriones

Enriquecimiento.- Se extrajo 5ml del triturado y se transfirió a 45ml de caldo APA con 2% de NaCl. Se incubó a 30°C por 24 horas. (Ver Figura Foto N°1).

Aislamiento.- Se sembró una asada del cultivo líquido sobre el agar TCBS. Fueron 04 las placas que se incubó a 35°C por 24 horas.

Diagnóstico presuntivo.- 14 fueron las colonias de bacterias seleccionadas entre amarillas (sacarosa positiva) y verdes (sacarosa negativa), características de las especies de *Vibrio*. (Ver Figura Foto N° 2).

Cepario.- cada colonia por separado se traspasó a un cepario que contenía Agar TSA al 2% con NaCl, para su conservación. También, a todas las cepas se volvieron a activar colocándolas en caldo TSB al 2% con NaCl y placas con Agar TSA al 2% con NaCl, incubándolas a 35°C x 24 Horas. Para realizarles las pruebas bioquímicas.

Aislamiento de Bacterias Lácticas

Enriquecimiento.- del triturado anterior, se extrajo 1ml y se colocó en un tubo que contenía 9ml de Caldo MRS. Posteriormente, se incubó a 35°C por 24 horas.

Aislamiento.- Se sembró una asada del líquido incubado sobre el agar MRS. Se incubó a 35°C por 48 horas.

Diagnóstico presuntivo.- Sobre el agar MRS se observó que no hubo crecimiento de bacterias.

Aislamiento de Pseudomona

Aislamiento.- del triturado se sembró por estriado, una asada sobre la placa de agar Cetrimide, se incubó a 35°C por 24 horas.

Diagnóstico presuntivo.- Sobre el agar Cetrimide se observó que no hubo crecimiento de bacterias.

2.2. Diagnóstico bioquímico diferencial.-

Para el diagnóstico bioquímico diferencial se realizó en dos etapas, pruebas primarias y pruebas complementarias de identificación (Ver Anexo. Cuadro2.).

2.3. Identificación bioquímica de selección e identificación.-

2.3.1. Prueba bioquímica diferencial de diagnóstico

Pruebas primarias de identificación: a los 14 ceparios se les realizó las pruebas de oxidasa.

Para las pruebas de oxidación fermentación medio Hugh y Leifson (Ver Figura Foto N°4) y la prueba de lisina descarboxilasa, se utilizó 05 colonias por separado.

Pruebas complementarias de identificación:

A las colonias anteriormente mencionada, se les realizó las siguientes pruebas: Oxidasa, Indol, Rojo Metilo, Voges-Proskauer, Glucosa, Lactosa, Sacarosa, L-lisina, L-ornitina, crecimiento en CINa al 3%, 6% y 10 %, SIM, H₂S, Gelatina, Citrato. Posteriormente, se identificó el género y la especie. (Ver Cuadro1 de resultados).

2.3.2. Prueba bioquímica comercial.-

Cada test API 20 NE incluyó 20 microtubos que contenían sustratos deshidratados. Los ensayos convencionales se inocularon con una suspensión bacteriana salina que constituyeron los medios.

Para esta prueba, se utilizó 09 cepas restantes, procedentes de los ceparios activados en placas que anteriormente fueron aisladas y se identificaron mediante los estuches comerciales.

Las reacciones que se produjeron durante la incubación se tradujeron en cambios de color, como también, mediante la adición de reactivos. (Ver anexo Foto N°5). Los resultados se realizaron mediante las técnicas del fabricante. La tabla de identificación y el reconocimiento se realizó mediante el Software API WEB. (Ver Cuadro 2 de resultados)

Tabla 1. Galería API 20 NE incluye 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados:

TEST	COMPONENTES ACTIVOS
NO ₃	Nitrato potásico
TRP	L- triptófano
GLU	D- glucosa
ADH	L- arginina
URE	Urea
ESC	Esculina Citrato Férrico
GEL	Gelatina
PNPG	4- nitrofenil-βD- galactopiranosida
GLU	D-glucosa
ARA	L- arabinosa
MNE	D-manosa
MAN	D-manitol
NAG	N-acetil-glucosa
MAL	D-maltosa
GNT	gluconato potásico
CAP	ácido cáprico
ADI	ácido adípico
MLT	ácido málico
CIT	citrato trisódico
PAC	ácido fenilacético
OX.	oxidasa

2.4. Almacenamiento.-

Las cepas seleccionadas fueron colocadas en tubos Eppendorf, que contienen caldo TSB al 2% de CINA con 2% de glicerol, como crioprotector y congeladas a -80 °C para su conservación y posterior uso.

3. RESULTADOS.-

De las 09 cepas, se aislaron 02 especies del género *Vibrio* y 01 del género *Pseudomona sp.*, como resultado de las pruebas complementarias efectuadas con el KIT API 20 NE.

También, se obtuvo por el método de las pruebas bioquímicas convencionales 05 cepas del género *Vibrio alginolyticus*, teniendo un total de 14 cepas aisladas e identificadas.

Cuadro 1. Resultado de las características bioquímicas por el método de Microbiología Convencional para la identificación de bacterias del género *Vibrio*

Test	V. <i>alginolyticus</i> tubo 1	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 3	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 4	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 7	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 8
Oxidasa	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-
Rojo Metilo	+	+	+	+	+
Voges- Proskauer	+	-	-	-	-
Glucosa	-	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+
L-lisina	-	-	-	+	+
L-ornitina	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+
SIM	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-
TCBS	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama

Cuadro 2. Resultado de las características bioquímicas con método del kit comercial API 20 NE para la identificación de bacterias del género *Vibrio*.

Test	V. <i>alginolyticus</i> tubo 2	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 5	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 6	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 9	V. <i>parahaemolyticus</i> Tubo 10	<i>Pseudomonas cepacia</i> . Tubo 11	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 12	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 13	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 14
NO3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRP	+	+	+	+	-	-	+	+	+
GLU	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Test	V. <i>alginolyticus</i> tubo 2	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 5	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 6	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 9	V. <i>parahaemolyticus</i> Tubo 10	<i>Pseudomona cepacia</i> . Tubo 11	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 12	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 13	V. <i>alginolyticus</i> Tubo 14
ESC	+	+	+	+	-	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNG	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GLU	-	+	-	+	+	+	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MNE	-	-	-	-	+	+	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	-	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GNT	+	-	+	-	+	+	+	+	+
CAP	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ADI	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PAC	-	-	-	-	-	+	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4. DISCUSIÓN.-

Los géneros *Vibrio* y *Pseudomona* integran un gran grupo de bacterias patógenas tanto para el humano como para los organismos marinos, en la vida natural como para el cultivo, es por ello el interés de la investigación y el estudio de los vibrios en esta especie marina representativa. El tracto digestivo de los organismos marinos posee mayor disponibilidad de materia orgánica que el agua de mar, transformándose en un ambiente apropiado para los vibrios aunque en este microambiente estén expuestos a un pH bajo, secreción de ácido bílico y a condiciones micro o anaeróbicas. UKAWA & RIVERA (2006).

En el presente estudio se destaca la presencia de *Vibrio alginolyticus*, debido a que fue la especie comúnmente aislada del estomago de *Etropus ectenes*. El género *Vibrio alginolyticus* (antes considerada como un biotipo del *Vibrio parahaemolyticus*), ha sido aislada en casos de vibriosis de peces e invertebrados marinos y su significado patológico ha sido dudoso, por lo que algunos autores coinciden en la necesidad de probar su capacidad de propiciar efectos patológicos. AUSTIN & AUSTIN .1987. *Vibrio alginolyticus* no solo se ha relacionado con enfermedades de peces, sino, ha sido asociada con la producción de toxinas en productos marinos. MAYER & WARD. 1991.

De las 09 cepas, se aislaron 02 especies del género *Vibrio* y 01 del género *Pseudomona sp.*, como resultado de las pruebas complementarias efectuadas con el KIT API 20 NE.

En el criadero o hatchery, existe la necesidad de contar con metodologías de diagnósticos rápidos en los cultivos marinos, para dar respuesta inmediata a los problemas, planteando la implementación de nuevas técnicas de mayor precisión. Muchos autores sugieren el uso de múltiples pruebas como el API 20. SANTOS et al. (1993).

Del trabajo realizado se conserva 14 cepas bacterianas aisladas e identificadas con un crioprotector y congeladas a -80°C para su posterior uso. La mayoría de métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los microorganismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación o por combinación de ambos. DOYLE A. (1999).

5. CONCLUSIONES.-

Sabemos que el *Etropus ectenes*, no es un pez de cultivo comercial para la acuicultura, pero la identificación bioquímica diferencial como los test rápidos de identificación, nos ha servido para afinar el protocolo y estandarizar el trabajo que se viene realizando en el laboratorio para el aislamiento e identificación de bacterias del tracto digestivo del lenguado. Las técnicas realizadas se utilizarán el próximo año cuando trabajemos con la especie *Paralichthys adspersus* para la obtención de bacterias benéficas del tracto digestivo de la especie en mención. Las bacterias presuntivas pertenecientes a las especies *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas cepacia*, serán nuevamente analizadas para su verificación definitiva. Actualmente conservamos las 14 cepas bacterianas con un crioprotector y congeladas a -80°C para su posterior uso. Del plantel bacteriano que se obtuvo, estas cepas pasarán a formar parte del banco de germoplasma de organismos marinos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

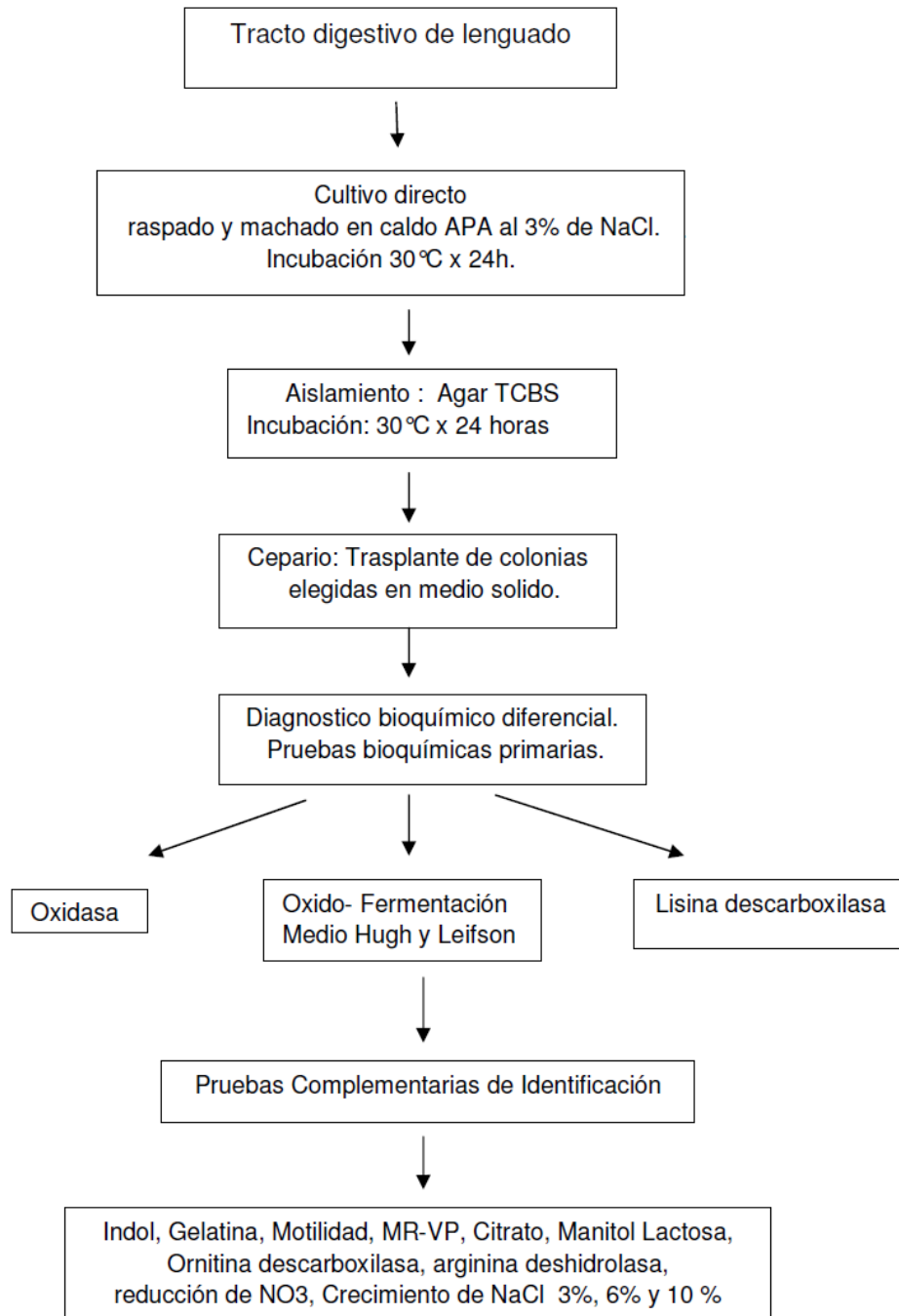
6. LITERATURA CITADA.-

- AUSTIN B & AUSTIN D. 1987. Bacterial fish pathogens, disease in farmed and wild Fish. Ellis Horwood; Chichester. Ellis Horwood Books Aquacult. Fish support 364p.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994. Ninth Edition. Lippincott William and Wilking Edition
- BIOMÉRIEUX SA. 2009/11. API 20 NE. Sistema de identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias. . Español-1. Ref 20050. France.
- COLWELL R. 1984. Vibrios in the Marine Environment. Wiley. N Y. 634p.
- DOYLE A. 1999. Guidelines for the establishment and operation of the collection culture of microorganisms. USD. Edition .
- MAYER B & WARD D. 1991. Microbiology of finsh and finfish processing Microbiology of marine food products. AVI USA. 340 pp.
- MASUMURA K, YASUNOBU H, OKADA N & MUROGA 1989. Isolation of a vibrio p, the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese Flounder larvae. Fish Pathology 24:135-141.
- COHA J, ALVARADO D, LEON J, RAMIREZ P. 1995. Manual de prácticas del curso de Microbiología II. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- REDONO P, ROMERO J, AREDONDO J & LOPEZ M. 2006. Relación entre la virulencia y presencia de plásmidos en bacterias *vibrio fluvialis* y *Vibrios furnisii*, aislada del pez dorado (*Carassius auratus*). Veterinaria México. Vol 37: 29-42.
- SANTOS Y, ROMALDE J, BANDIN I, MARIÑOS B, NUÑEZ S, BARJA J & TORANZO A. 1993. Usefulness of the API 20 E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aquaculture, 16: 11-20.
- SMITH P, HINEY M & SAMUELSEN B. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming. Critical evaluation of method and meaning. Ann.Rev. J. Fish.Dis. 4: 273-313
- SUBASINGHE R. 1997. Fish health and quarantine. En: FAO (Ed.). Review of the state of the world aquaculture. Fisheries circular no.886. Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO. Roma. 163.

- TORANZO A E & BARJA J. 1990. A review of de taxonomy and seroepizootiology of vibrio anguillarum, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. Diseases of Aquatic Organisms 9: 73-82.
- UKAWA H & RIVERA I. 2006. The biology of *vibrio*. Aquatic Enviroment. 12: 175-189. ASM. Press, Washington DC.

7. ANEXOS:

Cuadro. Organigrama de trabajo para identificación de bacterias Vibrios



8. FIGURAS.

FOTO N°1
Lenguado *Etropus ectenes*

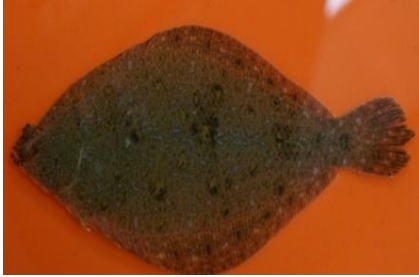


FOTO N°2
Agar TCBS colonias marcadas para trabajar



FOTO N°3
Ceparios en Agar TSA al 2% de NaCl
Reacción cintas de Oxidasa

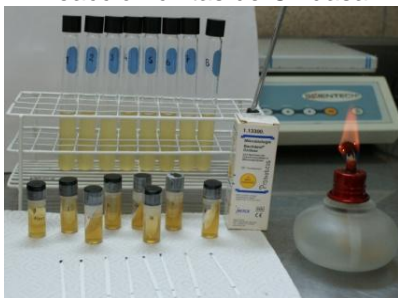


FOTO N°4
Oxidación Fermentación Medio
Hugh y Leifson



FOTO N°5
Test Bioquímico comercial
Cinta de API 20 N

