



RESPUESTA ANTAGÓNICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE LOS CULTIVOS DE MICROALGAS EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS MARINOS

Carmen Ruíz Huamán¹
cruiz@imarpe.gob.pe

RESUMEN.-

Durante el 2012, el Laboratorio de Cultivos Marinos obtuvo bacterias aisladas de los cultivos de microalgas. Se trabajó 60 colonias de los cultivos. Se confrontó una a una las colonias aisladas del cultivo de microalgas con las bacterias patógenas tipo ATCC, estas fueron: *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromona hydrophila*, *Lactococcus garviaceae* y *Vibrio herveyi*. Solo una bacteria tuvo interacción antagónica ya que formó el halo de inhibición.

La identificación bioquímica se le realizó por colorimetría con el Api 20 NE y dio como resultado *Vibrio alginolyticus*.

Palabras claves: colonia, bacterias patógenas, halo de inhibición, interacción antagónica.

ABSTRACT.-

During 2012, the Laboratory of Mariculture obtained bacterial isolates from microalgae cultures. Sixty colonies were isolated. The isolated colonies were confronted against *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromona hydrophila*, *Vibrio herveyi* and *Lactococcus garviaceae* ATCC type pathogenic bacteria. Only one bacterium showed antagonistic interaction forming the inhibition halo. *Vibrio alginolyticus*, was reported, by biochemical identification using API 20 NE

Key words: colony, pathogenic bacteria, inhibition halo, antagonistic interaction.

¹ Bióloga. Investigadora del Instituto del Mar del Perú - IMARPE. Encargada del Laboratorio de Alimento Vivo. Unidad de Investigaciones en Acuicultura. Apartado 22, Chuchito, Callao.

1. INTRODUCCIÓN.-

Los primeros estudios de bacterias marinas productoras de sustancias antibacterianas fueron realizados por Rosenfell y Zobell (1974). Desde entonces la búsqueda y aislamientos en los ecosistemas marinos de bacterias marinas con actividad antagónica sobre microorganismos de patógenos marinos y terrestres ha sido realizada por diversos hábitat, como agua de mar, sedimentos, fitoplancton, vertebrados e invertebrados. Toranzo *et al.*, (1982) Riquelme (1987).

Las interacciones antagónicas por bacterias que inhibe el crecimiento de microorganismos corresponden a un mecanismo que puede ayudar a mantener la composición de la especie bacteriana a nivel microescala. Lons & Azam (2001), ya sea por competencia de nutriente, espacio, luz y o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios entre ellos sustancias antibacterianas Dopazo *et al.*, (1988) Lemos *et al.*, (1991).

El efecto antagónico es muy frecuente en el ambiente marino y presentes por varios grupos bacterianos Avendaño Herrera *et al* (2005). Se han identificado interacciones antagónicas entre bacterias pelágicas y entre aquellas aisladas de la nieve. Long y Azam (2001). También, bacterias asociadas a superficies de macroalgas Lemos *et.al.*, (1985). En este sentido, la competencia por el espacio y los nutrientes básicos es una poderosa fuente selectiva que ha generado la evolución de variedades y adaptaciones efectivas en el hábitat bacteriano. La competencia por prevalecer la especie dentro de una comunidad de microorganismos es una importante fuerza selectiva que promueve la biosíntesis de los compuestos antimicrobianos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS.-

Se trabajó con el remanente de las siembras de las siguientes microalgas: *Nannochloris oculata* (Na), *Nannocloropsis maculata* (Np), *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Tetracelmis tetratele*, y *Nannocloropsis sp.* (Virrila) en estrictas condiciones de asepsia.

Aislamiento de Bacterias Marinas

Se sembró el sobrante por individual una asada por el método de agotamiento por estría en placas de agar marino a 25°C de 24 a 48 horas.

Una vez crecidas las colonias se seleccionó por sus características morfológicas: forma, color y textura. Se rotulo y se traspaso cada una al agar cepario para mantener y trabajar con ellas. Se obtuvo 60 colonias en total de las diferentes microalgas.

Activación de Bacterias Patógenas

Se activó en caldo TSB más Cloruro de Sodio las siguientes cepas patógenas: *Pseudomona aeruginosa*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromona hydrophila*, *Lactococcus garviaceae*, *Vibrio herveyi*. Estos organismos son una donación y son parte de la Colección del Cepario de Bacterias Marinas de Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

2.2. PRUEBAS DE EFECTO ANTAGÓNICO.

A las colonias seleccionadas se le realizó la técnica de multi- pocillos para verificar la respuesta cualitativa antagónica

2.2.1. Técnicas de identificación:

A las cepas patógenas, se le estandarizó por individual en medio líquido y se utilizó el Standard de Mc Farland 0,5 equivalente a 1×10^8 UFC/mL, luego se inocularon con un aplicador de algodón estéril en una placa petri de Agar Marino. Se realizó el siguiente procedimiento:

Método de agar por difusión en pocillos:

A las placas petri con Medio sólido Agar marino cultivada con el microorganismo patógeno, se procedió a cortar el agar mediante un sacabocados estéril formando un diámetro de 7mm de diámetro separados entre sí por 20 mm. A cada placa se le realizó siete orificios.

En cada pocillo se le adicionó por separado 50 µl del cultivo de las diferentes cepas nativas aislada de las diferentes microalgas. Fig. 1.

3. RESULTADOS

De las sesenta colonias aisladas y confrontadas una a una con las 5 cepas patógenas tipo ATCC, se obtuvo una bacteria que manifestó respuesta antagónica. Este microorganismo fue aislado del cultivo de la microalga *Isochysis galbana* y confrontada con la bacteria patógena *Flavobacterium psychrophilum*, como se muestra en la fig.1.

Esta bacteria tuvo las siguientes características: Colonia redonda, cremosa, amarilla pequeña (Crcap). Se le realizó la prueba de oxidasa con las cintas la identificación bioquímica con ayuda del KIT rápido API 20NE, incubada a 31°C por 24 y 48 horas. Se realizó las lecturas con el manual Api al 1° día y al 2° día, resultó *Vibrio alginolyticus*.

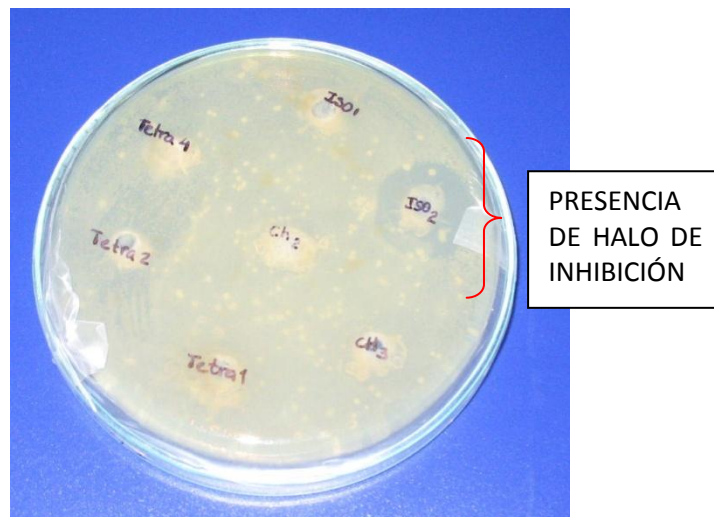


Figura 1. Respuesta Antagónica

4. DISCUSIÓN

La presencia de bacterias en relación al fitoplancton se considerada un fenómeno natural tal como describe RIQUELME *et al.* (1987), poniendo en evidencia que la mayor densidad de bacterioplancton ocurre solo después de la máxima producción de fitoplancton, sugiriendo que este aumento bacteriano se produce por la utilización de fitoplancton muerto y detritus.

La presencia de la bacteria del género *Vibrio alginolyticus* aislada del remanente del cultivo de *Isochysis galbana*, confrontado con el *Flavobacterium psychrophilum* se presencié una respuesta antagónica y respondió a una competencia de nutriente y

espacio. De esta forma, los organismos evolucionan y desarrollan mecanismos de producción de sustancias con actividad antibiótica tal como lo describe FREDRICKSON & STEPHANOPOULOS (1981).

5. CONCLUSIONES

Todas las bacterias que respondieron a la actividad antagonica son posibles potenciales probióticos.

Se requiere de estudios más complejos sobre la complejidad de estas interacciones antagonicas y del metabolismo del grupo bacteriano que fue inhibido.

6. LITERATURA CITADA.-

- AVENDAÑO HERRERA R, LODY M,RIQUELME CARLOS. 2005. Producción de sustancias inhibitoria entre bacteria de biopelículas en sustratos marinos. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 40(2) :117-125.
- BIOMÉRIEUX SA. 2009/11. API 20 NE. Sistema de identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias. . Español-1. Ref 20050. France.
- DOPAZO C P, LEMOS M L, BOLINCHES J, BARJA J L, TORANZO A E. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology 65: 97-
- FREDRICKSON A G, STEPHANOPOULOS G.1981. Microbial competition. Science 213: 972-979.
- LEMONS ML, DOPAZO C P, TORANZO A E, BARJA JL. 1991. Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed. Journal Applied Bacteriology 71: 228-232.
- LEÓN J, GARCÍA P. 1998. Cepas nativas del Bacterioneuston y su actividad Inhibitoria de bacterias Ictiopatógenas. Rev. Peruana de Biol. 5 (1): 49-66.
- LEÓN J, TAPIA G, AVALOS R. 2005. Purificación parcial y caracterización de una sustancia antimicrobiana producida por *Alteromonas* sp. de origen marino. Rev. Peru. biol. 12(3): 359-368.
- LONG R A, AZAM F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacterial. Applied and Environmental Microbiology 67:4975-4983.
- LEMONS ML, TORANZO AE & BARJA JL. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweed. Microbial Ecology 11: 149-163.
- RIQUELME CE, FUKAMI K, ISHIDA Y. 1987. Annual Fluctuations of phytoplankton and bacterial communities in Maizuru bay and their interrelationship. Bulletin of the Japanese Society of Microbial Ecology 2: 29-37.
- ROSENFELD W D, ZOBELL C.E. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. Journal Bacterial 154:393398
- TORANZO A, BARJA J, HETRICK F. 1982. Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. Can J. Microbiol. 28: 231-238.

7. ANEXOS

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

TEST	COMPONENTES ACTIVOS	Rx a las 24 Horas	Rx a las 48 Horas
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	+	+

Resultado: *Vibrio alginolyticus* al 92.7%