

BACTERIAS MARINAS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA AISLADAS DE MOLUSCOS BIVALVOS EN CULTIVOS

MARINE BACTERIA WITH ANTIMICROBIALS CAPACITY ISOLATED FROM CULTURES OF BIVALVE MOLLUSKS

Fabiola Pellón Y.^{1,2}, Rita Orozco M.² y Jorge León Q.¹

RESUMEN

Los microorganismos han sido siempre objeto de estudios como productores de sustancias antibacterianas; sin embargo, también son consideradas productores de sustancias antifúngicas, antivirales, antiparasitarias, citotóxicas e inhibitorias de otras formas de crecimiento celular.

Este trabajo describe el aislamiento, el potencial inhibitorio y la caracterización fenotípica de cepas bacterianas nativas asociadas a los moluscos bivalvos *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" y *Crassostrea gigas* "ostra" en sistemas de cultivo.

De un total de 345 cepas de bacterias colectadas se recuperaron 20 cepas marinas con capacidad inhibitoria de amplio espectro de bacterias patógenas de peces, moluscos y crustáceos; y los más sensibles fueron los patógenos *Aeromonas sobria* P-281, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 y *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17803. La caracterización fenotípica de las cepas con capacidad inhibitoria permitió identificar los siguientes géneros: *Vibrio* (40%), *Aeromonas* (15%), *Flavobacterium* (10%), *Pseudomonas* (5%), *Moraxella* (5%), *Flexibacter* (5%). No fueron identificadas 20%.

Los resultados sugieren que las bacterias aisladas podrían ser aprovechadas como agentes probióticos en el control biológico de patógenos de organismos marinos de interés en maricultura.

Palabras clave: Bacterias marinas, antibiosis, probióticos, maricultura, *Argopecten purpuratus*, *Crassostrea gigas*.

ABSTRACT

Microorganisms have commonly been studied as producers of antibacterial substances; yet they are also considered producers of antifungal, antiviral, antiparasitic, cytotoxics and inhibitory of other forms of cellular growth substances.

This paper describes the isolation, inhibitory potential and phenotypic characterization of native bacterial strains associated to bivalve mollusks such as *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" and *Crassostrea gigas* "ostra" in cultivation systems.

From 345 marine strains collected, 20 strains were recovered that had the ability of inhibiting a wide spectrum of fish, mollusks and shellfish pathogenic bacteria; being the most sensitive pathogens *Aeromonas sobria* P-281, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 and *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17803. The phenotypic characterization of this strains with inhibitory capacity allowed the identification of the following genera: *Vibrio* (40%), *Aeromonas* (15%), *Flavobacterium* (10%), *Pseudomonas* (5%), *Moraxella* (5%), *Flexibacter* (5%). A 20% could not be identified.

The results suggest that the isolated bacteria could be used as probiotics agents for the biological control of pathogens from marine organisms of interest in mariculture.

Key words: marine bacteria, antibiosis, probiotics, *Argopecten purpuratus*, *Crassostrea gigas*.

¹ Lab. Microbiología Ambiental y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.

² Lab. Microbiología, Instituto del Mar del Perú – IMARPE.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos marinos, así como algunos invertebrados han sido considerados virtuales productores de metabolitos biológicamente activos. Numerosos trabajos han revelado la existencia de cepas de bacterias marinas que producen diversos metabolitos secundarios, entre ellas las sustancias antibacterianas (Gauthier y Flatau, 1976; Dopazo *et al.*, 1988; Lemos *et al.*, 1985b; Marty y Martin, 1992).

En ambientes marinos la búsqueda de bacterias nativas con capacidad inhibitoria se ha realizado a partir de diversas muestras (agua, sedimentos, plancton, vertebrados e invertebrados) (Toranzo *et al.*, 1982; Lemos *et al.*, 1985b; Nair y Simidu, 1987; Dopazo *et al.*, 1988). Las superficies y espacios internos de organismos marinos son considerados microhábitats donde se encuentran regularmente los microorganismos, que son considerados objeto de estudio para el aislamiento de diversas bacterias con potencial biológico (Bonar *et al.*, 1986).

Los cultivos de bivalvos marinos, tales como *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" y *Crassostrea gigas* "ostras", se ven obstaculizados por la elevada mortalidad larval que se atribuye a la presencia de bacterias patógenas marinas como *Vibrio anguillarum* y *Vibrio alginolyticus* (Navarro *et al.*, 1991; Riquelme *et al.*, 1995). Por otro lado, los antibióticos son usados por los acuicultores como una forma de prevenir el establecimiento de bacterias patógenas y en el tratamiento de especies afectadas (Jeanthon *et al.*, 1988; Karunasagar *et al.*, 1994). Sin embargo, el uso de estos antibióticos tiene también aplicabilidad limitada en esta actividad, debido a que los patógenos marinos al igual que otras bacterias desarrollan la capacidad de resistencia a dichos antibióticos (Riquelme *et al.*, 1996) como consecuencia de la transferencia rápida de resistencia mediada por plásmidos (Westerdahl *et al.*, 1991). Un método alternativo para controlar los diferentes problemas

microbiológicos que se presentan en los sistemas de cultivos, podría ser la adición de cultivos puros de bacterias nativas productoras de sustancias inhibitorias de bacterias patógenas marinas (Riquelme *et al.*, 1996; Douillet y Langdon, 1994; León, 1996).

El presente trabajo, describe el aislamiento, el potencial inhibitorio y caracterización fenotípica de la flora nativa bacteriana asociada a cultivos de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" y *Crassostrea gigas* "ostra".

MATERIALES Y METODOS

Lugar de muestreo y recolección de muestras

Para el aislamiento y estudio de bacterias marinas con capacidad inhibitoria se colectaron 70 muestras de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" y 15 de *Crassostrea gigas* "ostra" cultivadas en las zonas denominadas El Carbón (12°27'06"S y 76°47'07"W) y La Tiza (12°26'00"S y 76°46'30"W) en Pucusana y la Isla San Lorenzo (12°05'30"S y 77°11'28"W) en el Callao. Las muestras fueron recolectadas en forma aséptica y conservadas en hielo hasta su procesamiento en el laboratorio.

Procesamiento de las muestras y aislamiento de bacterias marinas

Las muestras se procesaron mediante la técnica descrita por León (1996). Se realizó la disección respectiva de los bivalvos bajo condiciones estériles y se prepararon diluciones al décimo a partir de un primer homogenizado de tejido blando (25 g de tejido en 225 ml de agua de mar filtrada y esterilizada). Para el aislamiento de bacterias marinas las muestras diluidas se homogenizaron en un "vortex mixer", y se diseminaron alícuotas (0,1 ml) de cada dilución sobre la superficie de placas con Agar Marino Modificado (MA) (g/l: Bacto-peptona 5,0; Extracto de levadura 2,0; Bacto-

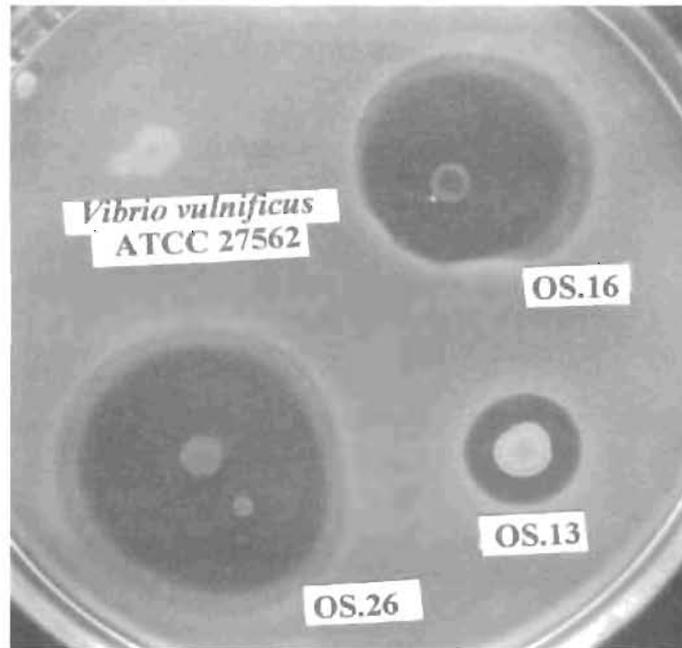


Figura 1. Inhibición de *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 por las cepas OS.16 y OS.26, (halos de inhibición de 25 y 30 mm de diámetro respectivamente) y la cepa OS.13 (halo de inhibición de 14 mm de diámetro).

agar 15,0; agua de mar añeja 750 ml y agua destilada 250 ml. pH final: 7,6). Las placas fueron sembradas por duplicado e incubadas a 20 °C durante 6 días.

Selección y conservación de bacterias inhibitorias

Para la selección de bacterias marinas productoras de sustancias inhibitorias se aplicó el método de "doble capa" según Dopazo et al. (1988) utilizando como cepa control a *Staphylococcus aureus* ATCC 6633. Las colonias de bacterias marinas que presentaron halos de inhibición frente a la cepa control fueron consideradas inhibitorias y conservadas en el medio MA semisólido para cultivos de rutina en estudios posteriores.

Pruebas de antibiosis frente a bacterias patógenas de peces y moluscos

Para las pruebas de antibiosis frente a bacterias patógenas de peces y moluscos se utilizaron 9 cepas patógenas de colección (dona-

das por la University of Maryland Biotechnology Institute, USA, y Universidad de Santiago de Compostela, España) (Tabla 1). El espectro de antibiosis de las cepas marinas aisladas fue evaluado por el método modificado de Westerdahl et al. (1991). Según este método las cepas en estudio se cultivaron para formar macrocolonias en el medio MA y fueron incubadas a 20 °C durante 5 días. Después de la incubación las placas con los cultivos fueron sometidos a vapores de cloroformo por 45 minutos e inmediatamente se agregó una segunda capa de agar semisólido previamente inoculado con la bacteria patógena en prueba. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 24-30 horas. La presencia de un halo de inhibición definido alrededor de las macrocolonias fue considerada actividad antibacteriana.

Caracterización fenotípica de bacterias inhibitorias

Las cepas inhibitorias de bacterias patógenas de peces y moluscos previamente

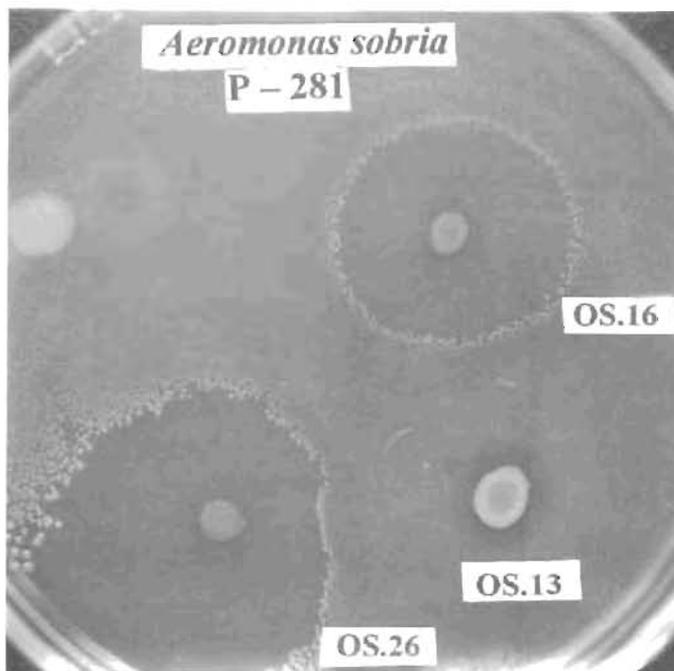


Figura 2. Actividad inhibitoria de las cepas OS.16, OS.26 y OS.13 sobre *Aeromonas sobria* P-281. Obsérvese las diferencias en la capacidad inhibitoria de las cepas nativas frente al patógeno (halos de inhibición de 31, 36 y 11 mm de diámetro respectivamente).

seleccionadas fueron sometidas a caracterización fenotípica. Estas cepas fueron evaluadas mediante pruebas morfológicas fisiológicas y bioquímicas siguiendo los procedimientos descritos por Baumann *et al.* (1972), Oliver (1982), Ortigosa *et al.* (1994), Jensen y Fenical (1995). La caracterización fenotípica se realizó mediante las siguientes pruebas convencionales: morfología celular, motilidad, carácter Gram, formación de pigmentos, luminiscencia, citocromo-oxidasa, catalasa, metabolismo oxidativo-fermentativo (OF), reducción de nitrato, actividades enzimáticas extracelulares (hidrólisis de gelatina, caseína, almidón, DNA, celulosa, tween 80, queratina y lecitina), requerimiento de agua de mar para el crecimiento y otras pruebas complementarias. El medio base para todas las pruebas fue Caldo Marino (MB) o Agar Marino (MA). La temperatura de incubación fue de 23 °C y la lectura final se realizó a los 4-5 días, excepto para la producción de enzimas extracelulares, caso en que el tiempo de incubación se prolongó hasta 10 días.

Identificación de bacterias inhibitorias

Para la identificación de bacterias inhibitorias a nivel de género se emplearon los esquemas taxonómicos para bacterias marinas de Oliver (1982), Sawabe *et al.* (1995) y Jensen y Fenical (1995). Adicionalmente se utilizó el sistema de identificación API 20NE (Sistema de Identificación de Bacterias Gram Negativas No Enterobacterias) para 5 cepas de bacterias aisladas que fueron seleccionadas por su mayor espectro de actividad inhibitoria de las bacterias patógenas en prueba.

RESULTADOS

Aislamiento y selección de bacterias inhibitorias

De un total de 85 bivalvos procesados se lograron obtener inicialmente 345 aislados de bacterias marinas, de las cuales 83 (100%) mostraron capacidad inhibitoria de la cepa control *Staphylococcus aureus* ATCC

Tabla 1. Cepas patógenas de peces y moluscos utilizadas en las pruebas de antagonismo.

CEPAS	AISLAMIENTO	PROCEDENCIA
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 2133 ^(a)	Desconocido	Noruega
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264 ^(a)	Bacalao	Dinamarca
<i>Vibrio splendidus</i> ATCC 33125 ^(b)	Salmonido	USA
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562 ^(b)	Salmonido	USA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17803 ^(b)	Desconocido	USA
<i>Aeromonas sobria</i> P - 281 ^(a)	Trucha "arco iris"	España
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 ^(a)	Trucha "arco iris"	España
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 ^(b)	Desconocido	USA
<i>Yersinia ruckeri</i> PP - 31 ^(b)	Trucha "arco iris"	España
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6633 *	—	Chile

^(a) Cepas donadas por la Dra. Alicia E. Toranzo, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología - Universidad de Santiago de Compostela, España.

^(b) Cepas donadas por la Dra. Rita Colwell, University of Maryland Biotechnology Institute, USA.

* Cepa utilizada como testigo en los ensayos de antagonismo

6633; y de ellas 45 (54%) cepas fueron aisladas de *Crassostrea gigas* "ostras" y 38 (46%) de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico".

Antibiosis frente a bacterias patógenas de peces y moluscos

De la totalidad de cepas inhibitorias aisladas inicialmente, 20 fueron seleccionadas por mostrar amplia actividad de antibiosis frente a las cepas de colección de bacterias patógenas de peces y moluscos (halos de inhibición promedio de 20 mm de diámetro). Del grupo de las cepas seleccionadas, 14 fueron aisladas de *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" (cepas CA) y 6 de *Crassostrea gigas* "ostras" (cepas OS). Los resultados de la actividad inhibitoria de las 20 cepas se observan en la tabla 2. Entre las cepas de mayor actividad inhibitoria estuvieron las indicadas por las siglas OS.26, OS.16, OS.13, CA.19 y CA.21; siendo las cepas OS.16, OS.26 y OS.13 las que mostraron actividad de amplio espectro sobre la totalidad de los patógenos ensayados.

Asimismo, los patógenos más sensibles a la actividad inhibitoria de las cepas marinas

fueron *Aeromonas sobria* P-281, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *V. parahaemolyticus* ATCC 17803 y *A. hydrophila* ATCC 7966, seguidas por otros patógenos miembros del género *Vibrio*. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y *Yersinia ruckeri* PP-31 considerados como patógenos de origen no necesariamente marinos mostraron menor sensibilidad.

Cabe resaltar la actividad inhibitoria mostrada por las cepas OS.26 y OS.16, las que además de su total antibiosis sobre los patógenos ensayados, presentaron halos de inhibición de hasta 35 mm de diámetro. Esta fuerte actividad mostrada frente a *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 y *Aeromonas sobria* P-281 se observa en las figuras 1 y 2. La cepa OS.13 también mostró actividad antagónica sobre la totalidad de los patógenos; sin embargo, la magnitud de su inhibición fue menor en comparación con otras cepas.

Caracterización fenotípica de bacterias inhibitorias

Las bacterias inhibitorias estudiadas mostraron características morfológicas y fisiológicas típicas de bacterias marinas (Tabla 3).

TABLA 2: Cepas de bacterias marinas aisladas de *Argopecten purpuratus* (CA) y *Crassostrea gigas* (OS) y sus actividades inhibitorias frente a cepas patógenas. Actividad determinada por el diámetro de los halos de inhibición: +: 3 – 7 mm; ++: >7 – 20 mm; +++: >20 mm y -: no inhibición.

Cepas marinas	Cepas patógenas										
	<i>V. anguillarum</i> NCMB 2133	<i>V. anguillarum</i> ATCC 19264	<i>V. splendidus</i> ATCC 33125	<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17803	<i>A. sobria</i> P 281	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>Y. ruckeri</i> PP 31	<i>S. aureus</i> ATCC 6633(*)	
OS.11	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	
CA.29	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	
CA.6	-	-	-	+	-	++	-	-	-	+	
CA.31	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
OS.13	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	
CA.35	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+++	
CA.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
OS.26	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
CA.8	+	+	-	+	++	+	++	-	-	+	
OS.49	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	
CA.28	+	+	-	-	+	-	++	-	-	++	
CA.21	-	-	++	++	++	++	++	-	-	++	
OS.27	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
CA.25	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	
CA.12	+	+	-	-	-	-	-	+	+	++	
OS.16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
CA.7	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	
CA.7 ^b	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	
CA.19	++	++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	++	
CA.34	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	

(*): Cepa control

Tabla 3. Características fenotípicas de 20 cepas de bacterias marinas inhibitorias de patógenos, aisladas de *Argopecten purpuratus* (CA) y *Crassostrea gigas* (OS).

Pruebas	Cepas marinas inhibitorias																				
	OS.11	CA.29	CA.6	CA.31	OS.13	CA.35	CA.5	OS.26	CA.8	OS.49	CA.28	CA.21	OS.27	CA.25	CA.12	OS.16	CA.7a	CA.7b	CA.19	CA.34	
Gram	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+
Catalasa	-	(+)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prod. H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	-	(+)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Luminisc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OF (Gluc)	F	NC	F	F	F	NC	NC	NC	NC	F	(K)	F	F	NC	F	NC	NC	(F)	O	F	F
Hidrol. Gel.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	-	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
Almidón	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fosfolip.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween.80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecitina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celulosa	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CINa:																					
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7%	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12%	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crec. 8°C	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42°C	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crec. TCBS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Req. H ₂ O de friar.	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	no	si	si	si	no	si	si

+, positivo; -, negativo; (), reacción débil; F, metabolismo fermentativo; O, metabolismo oxidativo; K, reacción alcalina; NG, no crece; NC, no cambio.

Tabla 4. Géneros identificados de bacterias marinas con actividad inhibitoria aisladas de *A. purpuratus* y *C. gigas* en cultivo.

GÉNERO	CEPAS	N.º de CEPAS	(%)
<i>Vibrio</i>	CA.6, CA.31, OS.13, CA.35, OS.49, CA.21, CA.12 y CA.34.	8	40
<i>Aeromonas</i>	OS.11, CA.28 y OS.27	3	15
<i>Flavobacterium</i>	OS.16 y OS.26.	2	10
<i>Pseudomonas</i>	CA.19	1	5
<i>Moraxella</i>	CA.25	1	5
<i>Flexibacter</i>	CA.8	1	5
No identificados	CA.29, CA.5, CA.7 ^a y CA.7 ^b	4	20
TOTAL		20	100

La mayoría de las cepas presentaron la forma típica de bacilos cortos y excepcionalmente en filamentos finos, todas Gram negativas con un marcado pleomorfismo. Asimismo, el 75% de las cepas presentaron movilidad por flagelos. En cuanto al comportamiento cultural en medio sólido la mayoría presentaron características similares, tales como colonias circulares y pequeñas (2 a 4 mm de diámetro), superficie lisa, convexas, brillosas, borde entero y de consistencia cremosa. Las cepas OS.26 y OS.16 presentaron características de cultivo similares, y ambas fueron colonias ligeramente elevadas, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa y pigmentación de color amarillo limón difusible en el medio. En cultivos prolongados las cepas OS.26 y OS.16 tornaron a un color amarillo ocre y la cepa CA.19 a verde fluorescente. En el Caldo Marino, la mayoría de las cepas presentaron turbiedad homogénea con desarrollo lento, sedimento moderado y escasa formación de película en superficie. Todas las cepas fueron positivas a la reacción de la oxidasa. Ninguna mostró luminiscencia.

En cuanto al metabolismo OF de la glucosa el comportamiento fue variable; sin embargo, sólo la cepa CA.19 mostró metabolismo oxidativo. Ninguna de las cepas produjo gas a partir de glucosa.

Con relación a la producción de enzimas extracelulares, la mayoría de cepas mostraron ser productores de algunas de estas enzimas tales como gelatinasa, tween esterasa,

fosfolipasa, DNAsa, lecitinasa, caseinasa, amilasa y quitinasa. Ninguna cepa fue positiva en la producción de ureasa y celulasa. En la prueba de requerimiento de agua de mar, la mayoría de las cepas requirieron de agua de mar para crecer, a excepción de las cepas OS.49, CA.12 y CA.19.

Identificación de las cepas inhibitorias

Las 20 cepas inhibitorias seleccionadas y caracterizadas fenotípicamente fueron identificadas como miembros de los géneros *Vibrio* (40%), *Aeromonas* (15%), *Flavobacterium* (10%), *Pseudomonas* (5%), *Moraxella* (5%) y *Flexibacter* (5%). Cuatro cepas no fueron identificadas (20%) (Tabla 4).

Los resultados con el sistema de identificación API 20NE fueron similares a los obtenidos mediante pruebas bioquímicas convencionales.

DISCUSIÓN

Trabajos orientados a la búsqueda de bacterias nativas con capacidad inhibitoria describen a dichas cepas como epibiontes, epífitas o parte de la microflora nativa del tracto digestivo del hospedero (Lemos *et al.*, 1985b; Bonar *et al.*, 1986). En consecuencia, nuestros resultados ratifican que invertebrados marinos como *Argopecten purpuratus* y *Crassostrea gigas* son también hospederos de una variada flora microbiana y entre ellas

aquellas que tienen actividad antibacteriana. Se afirma que en la interacción invertebrados-bacterias el rol que desempeñan los microorganismos está relacionado con actividades como simbiosis, sinergismo, antagonismo u otra modalidad de interacción (Bonar et al. 1986; Nair y Simidu, 1987). En el caso particular del presente trabajo, la capacidad inhibitoria de amplio espectro mostrada por las cepas evaluadas podría servir como base para estudios posteriores de la interacción antagonista de las bacterias frente a posibles patógenos en el hospedero.

La metodología aplicada utilizando como cepa testigo a *Staphylococcus aureus* ATCC 6633 fue clave en el aislamiento y selección inicial de un número considerable de cepas inhibitorias (83). El uso de esta bacteria (Gram positiva) como indicadora de antagonismo permitió recuperar mayor número de cepas marinas gracias a la alta sensibilidad inhibitoria mostrada en comparación con las bacterias Gram negativas (resultado no descrito). En este sentido, nuestros resultados son coincidentes con los trabajos de Lemos et al. (1985); Nair y Simidu (1987) y Barja et al. (1989) quienes a su vez utilizaron también bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* sp. y *Streptococcus*.

El antagonismo ensayado entre cepas de bacterias marinas y cepas referenciales de patógenos marinos Gram negativos han sido considerados de interés en acuicultura por Dopazo et al. (1988), Lemos et al. (1985), Westerdahl et al. (1991) y Riquelme et al. (1996, 1997). Resultados similares son obtenidos en las pruebas de antibiosis entre bacterias seleccionadas en el presente trabajo y la colección de patógenos de peces y moluscos. En consecuencia, la observación de una marcada efectividad inhibitoria sobre ictiopatógenos es evidentemente significativo tratándose además de cepas nativas aisladas de posibles hospederos de patógenos como es en este caso *Argopecten purpuratus* y *Crassostrea gigas*.

Por otro lado los patógenos marinos *Aeromonas sobria* P-281, *Vibrio anguillarum* ATCC 19264 y *V. anguillarum* NCMB 2133 evidenciaron mayor sensibilidad en comparación con los patógenos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y *Yersinia ruckeri* PP-31. Datos similares fueron obtenidos también por Lemos et al. (1985b), Nair y Simidu, (1987) y Fabregas et al. (1991).

Trabajos previos (Gauthier (1976), Barja et al. (1989) y Lemos et al. (1985) señalan que bajo condiciones de subcultivos prolongados muchas cepas ambientales pierden su capacidad antagonica en forma gradual, llegando inclusive a una pérdida total de actividad. En nuestro caso, si bien es cierto que se noto una ligera disminución de esta actividad en algunas cepas, la gran mayoría conservó el potencial inhibitorio en cultivos mantenidos hasta por 90 días (no descrito en el presente trabajo). Esta particularidad es importante tomar en cuenta para casos de una posible aplicación práctica. Un aspecto particular de muchas bacterias ambientales es el comportamiento frecuentemente variable frente a la tinción Gram ("Gram variable"). En nuestro caso, la mayoría de las cepas inhibitorias se observaron como Gram negativas durante la fase logarítmica pero como "Gram positivas" en cultivos tardíos. Esta característica para bacterias marinas es citada también por Gauthier (1975) e Imada et al. (1985).

A pesar de que la pigmentación de cepas no fue un criterio de selección en el presente trabajo, las cepas OS.16, OS.26 y CA.13 fueron pigmentadas y presentaron fuerte actividad inhibitoria con todos los patógenos ensayados. Autores como Gauthier (1975), Gauthier y Flatau (1976), Lemos et al. (1985), Dopazo et al. (1988), entre otros, seleccionaron sus cepas considerando la pigmentación, obteniendo en la mayoría de los casos cepas fuertemente inhibitorias. A partir de estos resultados podríamos suponer que ciertas bacterias marinas pigmentadas representarían

cepas con mayores potencialidades de producir sustancias inhibitorias de bacterias patógenas de organismos marinos.

El género predominante de las cepas inhibitorias fue *Vibrio* (40%). Este resultado no hace más que corroborar la microflora nativa que predomina en medios acuáticos asociados a organismos marinos. Sobre la base de estudios realizados por otros autores, los vibrios son comúnmente la fuente de sustancias inhibitorias y por tanto antagonistas a otras especies bacterianas del mismo hábitat sean o no patógenos de peces y moluscos (Buck y Meyers, 1965, Doggett, 1968, Olsson *et al.* 1992, León 1996, Riquelme *et al.* 1995, 1997). Cepas inhibitorias identificadas en el presente trabajo como *Flavobacterium* (OS.16 y OS.26) resultaron ser los mejores antagonistas y merecen sin duda estudios complementarios, a diferencia de aquellas reportadas por Okami (1986), quien a su vez resalta en *Flavobacterium* su actividad antiparasitaria.

Un aspecto de las bacterias marinas que ha sido tomada en cuenta muy escasamente es la capacidad de producir enzimas extracelulares. Al respecto, Ogawa y Shimazu (1999) consideran esta característica de suma importancia sobre todo por las aplicaciones que éstas tendrían en biotecnología. Nuestros aislados, además del potencial inhibitorio, resultaron tener capacidad en la producción de exoenzimas que actúan frente a diversos polímeros.

Los resultados obtenidos en este trabajo representan un aporte a las investigaciones recientes sobre bacterias marinas productoras de sustancias inhibitorias y su posible aplicación en acuicultura intensiva. En este sentido, queda abierta la posibilidad de que las cepas seleccionadas sean evaluadas en el control de patógenos que afectan a cultivos intensivos de invertebrados como de larvas de *Argopecten purpuratus* y *Crassostrea gigas*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barja, J.; M. Lemos y A. Toranzo. 1989. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrobial agent and chemotheraphi*. **33**: 1673-1679.
- Baumann, L.; M. Baumann; M. Mendel y R. Allen. 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.* **110**: 402-429.
- Bonar, D.; R. Weiner y R. Colwell. 1986. Microbial invertebrate interactions and potential for biotechnology. *Microb. Ecol.* **12**: 101-110.
- Buck, J. y S. Meyers. 1965. Anti-yeast activity in marine environments: Ecological considerations. *Limnol. Oceanographic*. **10**: 385-391.
- Doggett, R. 1968. New anti-*Pseudomonas* agent isolated from a marine *Vibrio*. *J. Bacteriol* **95**: 1972-1973.
- Dopazo, C.; M. Lemos; C. Lodeiros; J. Bolinches; J. Barja y A. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 97-101.
- Douillet, P. y C. Langdon. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific Oyster. (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*. **119**: 25-40.
- Fabregas, J.; A. Muñoz; A. Otero; J. Barja y M. Romaris. 1991. A preliminary study on antimicrobial activities of some bacteria isolated from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **57**(7): 1377-1382.
- Gauthier, M. 1975. Morphological, physiological and biochemical characteristic of some violet-pigmented bacteria isolated from seawater. *Can. J. Microbiol.* **22**: 138-149.
- Gauthier, M. 1976. *Alteromonas rubra* sp. Nov; a new marine antibiotic-producing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 459-466.
- Gauthier, M. y G. Flatau. 1976. Antibacterial activity of marine violet - pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Can. J. Microbiol.* **22**: 1612-1619.
- Imada, C.; U. Simidu y N. Iaga. 1985. Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline, protease inhibitor. *Bull. Jpn. Soc. Sc. Fish.* **51**: 799-803.
- Jeanthon, C.; D. Prieur y J. Cochard. 1988. Bacteriological survey of antibiotic treated sea waters in a *Pecten maximus*. Hatchery. *Aquaculture*. **71**: 1-8.
- Jensen, P. y W. Fenical. 1995. The relative abundance and seawater requirements of Gram positive bacteria in near-shore tropical marine samples. *Microb. Ecol.* **29**: 249-257.

- Karunasagar, I.; R. Pai y G. Malathi. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harvey* infection. *Aquaculture*. **119**: 25-40.
- Lemos, M.; A. Toranzo y J. Barja. 1985b. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal sea-weeds. *Microb. Ecol.* **11**: 149-163.
- León, J. 1996. Cepas nativas del Bacterioneuston marino con actividad antagónica frente a bacterias ictiopatógenas; caracterización preliminar de sustancias inhibitorias. Tesis de Grado de Magister en Ciencias Microbiológicas. Universidad Católica de Valparaíso. Instituto de Biología. Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas.
- Marty, P. y Y. Martin. 1992. Aerobic heterotrophic bacteria associated with some Mediterranean coastal benthic invertebrates: Characterization of strains, exoenzyme and antibiotic production. *Mar Life*. **1(1)**: 1-8.
- Navarro, R.; L. Sturla; O. Cordoco y M. Avedaño. 1991. Fisheries and Aquaculture: Chile. Pp 1001-1015. In *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Nair, S. y U. Simidu. 1987. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2957-2962.
- Ogawa, J. y S. Shimizu. 1999. Microbial enzymes new industrial applications from traditional screening methods. *Trends in Biotechnology*. **17**: 13-20.
- Okami, Y. 1986. Marine microorganism as a source of bioactive agents. *Microb. Ecol.* **12**: 67-68.
- Oliver, J. 1982. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-sea Res.* **29**: 795-798.
- Olsson, J.; A. Westerdahl; P. Conway y S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dab (*Limanda limanda*). Associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58(2)**: 551-556.
- Ortigosa, M.; E. Garay y M. Pujalte. 1994. Numerical taxonomy of aerobic, Gram-negative bacteria associated with oysters and surrounding seawater of the mediterranean coast. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 589-600.
- Riquelme, C.; G. Hayashida; N. Vergara; A. Vasquez; Y. Morales y P. Chavez. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture*. **138**: 49-60.
- Riquelme, C.; G. Hayashida; R. Araya; A. Uchida; M. Satomi y Y. Ishida. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic Vibrios. *J. Shellfish Research* **15**: 369-374.
- Riquelme, C.; R. Araya; N. Vergara; A. Rojas; H. Guaita y M. Candia. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallops *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). *Aquaculture* **154**: 17-26.
- Sawabe, T.; Y. Oda; Y. Shiomi y Y. Ezura. 1995. Alginate degradation by bacteria from the gut of sea urchins and sponges. *Microb. Ecol.* **30**: 193-202.
- Toranzo, A.; J. Barja y F. Hetrick. 1982. Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. *Can J. Microbiol.* **28**: 231-238.
- Westerdahl, A.; J. Olsson, J.; S. Kjelleberg y P. Conway. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2223-28.