



T
639.543
3687
C.2

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA
Y CIENCIAS DEL MAR



"MINIATURIZACION Y SIMPLIFICACION DE PRUEBAS
BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS
MARINAS ASOCIADAS AL CAMARON"

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de:
ACUICULTOR

Presentada por

ARTURO/SOLIS PAREDES

GUAYAQUIL - ECUADOR

1996

DEDICATORIA

A mis padres,

Sonia y Gustavo.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme dado todo su apoyo durante el desarrollo de mis estudios y tesis, por sus consejos y ejemplo que me ayudaron a salir adelante con mi trabajo.

A mis hermanos, por su ayuda y cariño.

Al CENAIM por brindarme todas las facilidades para la realización de esta tesis.

Al Dr. Jorge Calderón, director del CENAIM, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis en el centro.

Al Dr. Eric Mialhe, por su ayuda y consejos en la dirección de mi tesis.

A Lorena, por todo el tiempo que perdiste para ayudarme con mi tesis y principalmente por tu amistad.

A Paulita, por haberme enseñado todo lo que sé de bioquímicas.

A Virna, por haber ayudado en la corrección de mi tesis.

A todos mis amigos del CENAIM, que siempre me ayudaron cuando lo necesitaba.

DECLARACION EXPRESA

" La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



Arturo Solís Paredes



Ph.D. Jorge Calderón
Presidente del Tribunal



Ph.D. Efic Mialhe
Director de Tesis



Dra. Nelly Camba
Miembro del tribunal



Dra. Tamara de Ross
Miembro del tribunal

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de Contenido	i
Indice de Figuras	iii
Indice de Tablas	iv
Indice de Fotos	v
Lista de abreviaturas	vi
Resumen	viii
Introducción	1
1. Antecedentes	4
1.1. Bacterias marinas asociadas al camarón.....	4
1.2. Familia Pseudomonadaceae	6
1.2.1. Descripción y propiedades metabólicas del género Pseudomonas	8
1.3. Familia Vibrionaceae	8
1.3.1. Descripción y propiedades metabólicas del género Aeromonas	10
1.3.2. Descripción y propiedades metabólicas del género Photobacterium	10
1.3.3. Descripción y propiedades metabólicas del género Vibrios	11
1.4. Principios de la identificación bacteriana	13
1.4.1. Aislamiento de bacterias	14
1.4.2. Características fenotípicas usadas en identificación bacteriana	15
1.5. Sistemas de identificación bioquímica	24
2. MATERIALES Y METODOS	26
2.1. Material biológico	26
2.2. Aislamiento de bacterias.....	27
2.2.1. Medios de aislamiento.....	27
2.3. Técnica clásica de identificación bioquímica	28
2.3.1. Siembra de bacterias para identificación bioquímica	28
2.3.2. Pruebas morfológicas	29
2.3.3. Pruebas bioquímicas	30
2.4. Lectura de resultados	36

3. RESULTADOS Y DISCUSION	37
3.1. Bacterias seleccionadas asociadas a camarón	37
3.2. Pruebas escogidas	38
3.3. Elaboración de pruebas bioquímicas con el sistema miniaturizado tomando como referencia a la técnica clásica	41
3.4. Evaluación del sistema miniaturizado para la identificación bioquímica tomando como referencia a la metodología clásica	49
3.5. Aplicación del sistema miniaturizado para la identificación de bacterias desconocidas	49
Conclusiones	56
Recomendaciones	61
Bibliografía	62
Anexos	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Aislamiento de bacterias por rayado en estrías.....	15
Figura 2.	Aislamiento de bacterias por esparcimiento.....	15
Figura 3.	Morfología de las colonias bacterianas.....	17
Figura 4.	Pared celular de una bacteria Gram positiva.....	18
Figura 5.	Pared celular de una bacteria Gram negativa.....	19
Figura 6.	Producción de indol por microorganismos a partir de triptófano	21
Figura 7.	Hidrolización de la arginina.....	23
Figura 8.	Descarboxilación de la ornitina.....	23

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características de las familias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae y Pseudomonadaceae.....	7
Tabla 2.	Características de miembros de la familia Vibrionaceae	9
Tabla 3.	Pruebas útiles para diferenciar bacilos móviles, Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos.....	39
Tabla 4.	Pruebas que diferencian los géneros Pseudomonas, Aeromonas, Photobacterium y Vibrios, y especies de Vibrios.....	40
Tabla 5.	Comparación de los resultados obtenidos en la técnica clásica y la miniaturizada.....	50
Tabla 6.	Evaluación del sistema miniaturizado tomando como referencia la técnica clásica utilizando cepas conocidas.....	51
Tabla 7.	Resultados de las pruebas bioquímicas de cepas desconocidas	54

INDICE DE FOTOS

Foto 1.	Prueba de crecimiento al 0% de NaCl	31
Foto 2.	Prueba para determinar el tipo de metabolismo	32
Foto 3.	Prueba de producción de Indol	33
Foto 4.	Prueba de Voges - Proskauer.....	34
Foto 5.	Prueba para la detección de enzimas específicas a aminoácidos.....	35
Foto 6.	Prueba de asimilación de carbohidratos.....	36
Foto 7.	Técnica clásica de identificación bioquímica.....	42
Foto 8.	Técnica miniaturizada de identificación bioquímica.....	42



LISTA DE ABREVIATURAS

Aero.	<i>Aeromonas</i> spp.
B668B	<i>Pseudomonas</i> sp.
B743Hm	<i>Vibrio alginolitycus</i>
B732Bt	<i>Vibrio harveyi</i>
B754T	<i>Vibrio anguillarum</i>
B707HL1	<i>Vibrio parahaemolitycus</i>
B747D	<i>Vibrio damsela</i>
B778C	<i>Vibrio splendidus</i> II
BHI	Beaf Heart Infusion agar
BPV	Virus Baculovirus Penaei
E22	<i>Vibrio harveyi</i>
ILI	<i>Vibrio alginolitycus</i>
IHHNV	Virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética
mM	Mili mol
MR-VP	Methyl red-Voges Proskauer
NA	Agar nutritivo
NB	Caldo nutritivo
O-F	Oxidativo-Fermentativo
Photo.	<i>Photobacterium</i> spp.
Pseu.	<i>Pseudomonas</i> spp.
TCBS	Thiosulphate-citrate-bile salt-sucrose agar
TSA	Tryptic Soy agar
V. alg.	<i>Vibrio alginolitycus</i>
V. ang.	<i>V. anguillarum</i>
V. cam.	<i>V. campbelli</i>
V. cho.	<i>V. cholera</i>
V. dam.	<i>V. damsela</i>
V. fis.	<i>V. fisheri</i>
V. flu.	<i>V. fluvialis</i>
V. fur.	<i>V. furnissi</i>
V. har.	<i>V. harveyi</i>
V. hol.	<i>V. hollisae</i>
V. log.	<i>V. logei</i>
V. mar.	<i>V. marinus</i>
V. ner.	<i>V. nereis</i>

V. par.	<i>V. parahaemolitycus</i>
V. pel.	<i>V. pelagicus</i>
V. pen.	<i>V. penaeicida</i>
V. sple I.	<i>V. splendidus</i> I
V. sple II.	<i>V. splendidus</i> II
V. tub.	<i>V. tubiashi.</i>
V. vul.	<i>V. vulnificus</i>
158	<i>Vibrio alginolitycus</i>

RESUMEN

A partir de una revisión sobre las bacterias que se han descrito como asociadas al camarón se seleccionó un grupo de criterios bioquímicos que permitan su identificación de forma específica. Para esto se miniaturizó la técnica clásica de identificación bioquímica utilizando microplacas, lo que permitirá un ahorro de tiempo (facilidad en la manipulación) y de dinero (menores volúmenes de medios de cultivo).

Se escogieron un total de 21 pruebas, las cuales son las necesarias y suficientes para caracterizar e identificar *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Photobacterium* spp. y *Vibrio* spp. (estos últimos a nivel de especie), estas pruebas son: forma celular, motilidad, reacción de Gram, oxidasa, catalasa, crecimiento al 0% de NaCl, tipo de metabolismo (oxidativo y fermentativo), producción de indol, reacción de Voges - Proskauer, ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, asimilación de L-arabinosa, celobiosa, D-manitol, D-manosa, sucrosa, D-glucuronato, D-gluconato y D-galactosa.

Se realizaron las pruebas bioquímicas de bacterias conocidas utilizando la técnica clásica conjuntamente con la técnica miniaturizada. Se obtuvo un 100% de similitud en los resultados obtenidos utilizando ambas técnicas. Posteriormente para la aplicación de la nueva herramienta se identificaron un total de 36 aislados bacterianos.

INTRODUCCION

El cultivo comercial del camarón (*Penaeus vannamei*) en Ecuador constituye una de las principales actividades generadoras de divisas para el país, superada solo por el petróleo y el banano.

Esto ha llevado a que el país posea actualmente una importante infraestructura en cuanto a laboratorios de larvas y fincas camaroneras se refiere. Como consecuencia de este desarrollo acelerado de la industria camaronera, se han presentado varios problemas de diversa índole, siendo uno de los mayores las enfermedades.

Las principales enfermedades, económicamente importantes, que afectan a esta especie son de origen viral y bacteriano. Entre los virus que comúnmente afectan al camarón, encontramos el BPV y el IHHNV, mientras que las enfermedades bacterianas son debidas principalmente a especies de vibrios.

Las condiciones de cultivo, tanto en laboratorios como en camaroneras, tales como altas densidades de cultivo, suministro de alimento natural y artificial, uso de tanques y piscinas en sistemas cerrados (con poco o sin recambio de agua), uso indiscriminado de antibióticos, entre otras, ocasionan la proliferación de bacterias y la aparición de cepas resistentes.

Es lógico considerar que los camarones se encuentran naturalmente asociados a bacterias no patógenas, a bacterias realmente patógenas así como a bacterias referidas como patógenas oportunistas, lo que significaría que en función de las condiciones de cultivo y/o de la fisiología del camarón, la presencia de bacterias podría corresponder a una enfermedad.

El conocimiento de la naturaleza de las interacciones existentes entre las bacterias y el camarón constituye una prioridad para mejorar su cultivo, siendo un punto importante a considerar las interacciones entre bacterias con el fin de explorar el concepto de probiosis y explotar las cepas que tienen esta capacidad de competir con bacterias patógenas.

Con este concepto de cultivo de camarón y de control de problemas bacteriológicos, existe un punto de bloqueo que debe inicialmente ser considerado y resuelto, que es el desarrollo de herramientas de identificación bioquímica especialmente concebidas para bacterias asociadas al camarón y para ser empleadas en encuestas epidemiológicas de gran amplitud, ya que hasta ahora las metodologías de identificación de estas bacterias son realmente inadecuadas.

Rutinariamente, el procedimiento utilizado para la caracterización e identificación de cepas bacterianas se basa en la observación del color de las colonias en agaros selectivos para vibrios, como el TCBS, tomando a las colonias verdes como patógenas y a las amarillas como no patógenas, este criterio no es aplicado adecuadamente, ya que el simple hecho de que una especie bacteriana pueda asimilar un carbohidrato en un medio específico no puede decir de que bacteria se trata y menos si es patógena o no.

Ocasionalmente, la caracterización e identificación de bacterias es hecha por medio de pruebas bioquímicas, para lo cual se puede realizar la técnica clásica de identificación bioquímica o utilizar "Kits" comerciales de diagnóstico, como el conocido API. Ambos métodos tienen desventajas para la camaronicultura, ya que en el primero se realizan un gran número de pruebas que se llevan a cabo en tubos de ensayo usando 5 ml de medio para cada prueba por lo que resultan tediosas y costosas. El segundo método fue diseñado para identificar bacterias relacionadas a salud humana y tiene un alto costo.

El objetivo de esta tesis ha sido el de desarrollar una herramienta que posea un grupo de criterios bioquímicos que permitan identificar bacterias marinas, y más concretamente bacterias que han demostrado estar asociadas al camarón. Esta herramienta fue concebida como un sistema miniaturizado que permite un ahorro de tiempo (facilidad en la manipulación) permitiendo identificar un gran número de muestras por día y de dinero (al usar menor volumen de medios de cultivo).

1. ANTECEDENTES

1.1 BACTERIAS MARINAS ASOCIADAS AL CAMARON

Las bacterias marinas juegan un papel importante como causantes de enfermedades en camarones provenientes de acuicultura, mientras que no es claro su rol en las poblaciones del medio natural (Sparks, 1985).

Colonizaciones bacterianas por agentes filamentosos en la cutícula y branquias han sido documentadas en camarones del medio natural y también han sido mostradas como responsables de epidemias en camarones cultivados (Fisher, 1977 a,b,c, Lightner, 1977, Lightner, 1988).

Algunas de estas bacterias filamentosas y formadoras de cadena son *Thiothrix* sp., *Flexibacter* sp., *Citofaga* sp., *Flavobacterium* sp, siendo *Leucothrix mucor* el agente epibionte filamentoso más importante en crustáceos marinos (Lightner, 1988). Infestaciones por bacterias filamentosas pueden ser fácilmente detectadas con un microscopio compuesto (100 X o más) especialmente en setas de urópodos, pleópodos, periópodos, anténulas y laminillas branquiales.

Bacterias Gram-positivas pueden ser ocasionalmente encontradas en camarones peneidos, sin que su naturaleza sea claramente identificada (Vanderzant *et al.* ,1971, Christopher *et al.* ,1978)

Las bacterias Gram-negativas son predominantes en ambientes marinos (Brisou *et.al*, 1965) y usualmente constituyen la mayoría de las bacterias presentes en la microflora normal de camarones peneidos cultivados y silvestres, asociadas a intestino, branquias y cutícula. (Vanderzant *et al.* 1970a, 1971, Yasuda y Kitao, 1980).

Aquellas que causan septicemias en camarones son predominantemente miembros de la familia Vibrionaceae, y principalmente del género *Vibrio* (Krantz *et al.* 1969; Vanderzant *et al.* 1970b; Lewis, 1973; Brinkle *et al.* 1976; Lightner, 1977, 1983, 1985, 1988; Overstreet, 1978). Otras representantes de la familia Vibrionaceae implicadas en enfermedades de camarones son *Aeromonas* spp. (Lightner y Lewis, 1975; Lightner 1977, 1983, 1985, 1988) y *Photobacterium* spp. (Austin, 1995). Por otra parte, bacterias del género *Pseudomonas* (familia Pseudomonaceae) también han sido asociadas con enfermedades de camarones (Barkate, 1972; Lightner, 1983, 1985).

Entre las especies del género *Vibrio* spp. implicadas como agentes causantes de infecciones y enfermedades en camarones peneidos se encuentran *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. splendidus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* (Lightner, 1993), *V. anguillarum* (Lewis, 1973; Lightner y Lewis, 1975; Rosemark y Fisher, 1988), *V. cholerae* (Guoxing, 1986), *V. aestuarianus*, *V. pelagius*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. nereis*, *V. tubiashii* (Austin, 1995), *V. logei*, *V. marinus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* (Lightner, 1995) y *V. penaeicida* (Ishimaru *et al.* 1995).

Los camarones peneidos pueden ser infectados en cualquier estadio, pero particularmente las larvas y post-larvas. En cultivo, parece que las vibriosis se presentan en circunstancias de sobrepoblación, bajas concentraciones de oxígeno disuelto y otras características del agua tales como temperaturas altas, bajos recambios y pobre calidad (Barkate, 1972; Vanderzant *et al.* 1970a; Lewis, 1973; Lightner, 1975; Lightner, 1977, 1983, 1985, 1988; Baticados, 1988).

Debido a que un gran número de vibrios se presentan en la microflora de camarones sanos y enfermos, se ha considerado que algunas especies de ellos pueden ser patógenos oportunistas, es decir que una cepa pueda ser patógena o no en función del

contexto. Sin embargo, otra interpretación está ligada al hecho de que la identificación de cepas bacterianas de camarones es muy imprecisa. Así, el concepto de patógeno oportunista podría ser sometida a cuestionamiento en cierto número de casos, siendo dos cepas confundidas según los criterios taxonómicos utilizados mientras que corresponden a una cepa patógena y a una no patógena.

A pesar de esta posible conducta oportunista de vibrios de camarones peneidos, algunos síndromes recientes de camarones peneidos han sido causados por *Vibrio* spp., los cuales se comportan más como patógenos reales que como patógenos oportunistas (Lightner, 1993).

1.2. FAMILIA PSEUDOMONADACEAE

Esta familia pertenece al grupo 4 (bacilos y cocos Gram-negativos aerobios/microaerófilos) de la clasificación de bacterias según el manual de Bergey (1994). Los miembros pertenecientes a esta familia son bacilos Gram-negativos rectos o ligeramente curvos, mótils por medio de flagelos polares, estrictamente aerobios, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en ambientes acuáticos (Frerichs & Millar, 1993).

Tabla 1.- Características de las familias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, y Pseudomonadaceae

Características	Entero bacteriaceae	Vibrionaceae	Pseudomona daceae
Diámetro celular, μm	0.3-1.5	0.3-1.3	0.5-1.0
Forma celular:			
Bacilos rectos	+	D	+
Curvos	-	D	+
Tinción de Gram	-	-	-
Acidez desde D-glucosa	+	+	D
Productos de fermentación del azúcar:			
Ethanol	-	-	
Acido láctico	-	-	
Acido acético	-	-	
Motilidad	D	+ ^e	D
Presencia de flagelos:			
Polar	-	+	+
Lateral	+	-	-
Ambos	-	D	
Oxidasa	-	D	D
Catalasa	+ ^e	D	D
Reducción de NO_3 a NO_2	+ ^e	+ ^e	
Producción de Indol	D	D	-
Requerimiento de Na^+ para crecimiento	-	D	D
Requerimiento de nitrógeno orgánico	- ^e	- ^e	

+ = 90% o más de las especies son positivas

- = 90% o más de las especies son negativas

D = algunas especies son positivas, algunas negativas

e = Pueden darse pocas excepciones

1.2.1. Descripción y propiedades metabólicas del género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* (familia Pseudomonadaceae), posee aproximadamente 27 especies reconocidas (Sanders & Fryer, 1991). Las especies de *Pseudomonas* son nutricionalmente no exigentes y pueden ser aisladas en medios generales, tales como BHI, TSA o NA, con temperaturas de incubación de 20 a 25°C Pueden producir pigmentos, en particular fluorescentes, que son importantes para su caracterización.

Los representantes del género *Pseudomonas* spp. son bacilos rectos o ligeramente curvos de aproximadamente 0.5-1.0 X 1.5-5.0 μm de tamaño; Gram-negativos; mótils por uno o varios flagelos polares sin envoltura; quimioheterótrofos; muchas especies acumulan poli- β -hidroxibutirato como reserva de carbón; son estrictamente aerobios, dando una reacción oxidativa en la prueba O-F; la mayoría de las especies son oxidasa positivos; todas son catalasa positivos y producen arginina dihidrolasa; la mayoría no pueden crecer en condiciones ácidas (pH 4.5) y no requieren factores orgánicos de crecimiento.

1.3. FAMILIA VIBRIONACEAE

Esta familia pertenece al grupo 5 (bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos) de la clasificación de bacterias según el manual de Bergey (1994). Estas bacterias son bacilos rectos o curvos usualmente mótils por medio de un flagelo polar; quimio-organotróficos, con ambos tipos de metabolismo respiratorio y fermentativo. Esta familia posee tres géneros de interés, *Vibrio*, *Aeromonas* y *Photobacterium*.. La mayoría de estos microorganismos son acuáticos, ampliamente distribuidos en agua dulce y el mar. Constituyen los más frecuentemente encontrados en camarones. (Frerichs & Millar, 1993).

Tabla 2.- Características de miembros de la familia Vibrionaceae

Características	<i>Vibrio</i>	<i>Photobacte rium</i>	<i>Aeromo nas</i>
Flagelo polar cubierto	+	-	-
Motilidad	+	+	(+) ^e
Acumulación de poly- β - hidroxibutirato con la inhabilidad de utilizar β - hidroxibutirato	-	+	
Requerimiento de Na ⁺ para crecimiento	+	+	-
Lipasa	(+) ^b	D	(+)
Utilización de D-manitol	(+) ^c	-	(+)
Sensibilidad al compuesto vibriostático O/129	+	+	-
Mol% G+C de ADN	38-51	40-44	57-63

+ = todas las especies son positivas

(+) = la mayoría de las especies son positivas

- = todas las especies son negativas

D = algunas especies son positivas, algunas negativas

^b = *V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, y *V. costicola* son negativos

^c = *V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, y *V. marinus* son negativos

^e = Excepto *A. medio* y *A. salmonicida*

1.3.1. Descripción y propiedades metabólicas del género *Aeromonas*

Las especies de este género pueden ser aisladas en NA o en TSA, siendo su crecimiento usualmente inhibido en agar TCBS. Cepas de *Aeromonas salmonicida* no son mótils y pueden ser aisladas en TSA, produciendo colonias pequeñas y con pigmentación café. Cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* son mótils. La temperatura óptima de crecimiento es de 22 a 28°C.

Son bacilos rectos con extremos redondeados casi esféricos (0.3-1.0 µm de diámetro y 1.0-3.5 µm en longitud); aparecen solos, en pares o en cadenas cortas; Gram-negativas; usualmente mótils por un flagelo polar simple; son bacterias anaerobias facultativas; quimio-organotróficas, con ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo; oxidasa y catalasa positivo; usualmente arginina dihidrolasa positivos y ornitina descarboxilasa negativos; reducen nitratos y pueden crecer en agua dulce.

1.3.2. Descripción y propiedades metabólicas del género *Photobacterium*

Las colonias de *Photobacterium* spp. no son características, siendo convexas y lisas. Su coloración es más blanca que otras bacterias marinas Gram-negativas probablemente debido a su contenido relativamente bajo de citocromos. La temperatura óptima de crecimiento parece ser 18-25°C.

Cepas de las especies *Photobacterium phosphoreum* y *P. leiognathi* están ampliamente distribuidas en ambientes marinos y han sido aisladas del agua de mar, de la cutícula y de contenidos intestinales de animales marinos; son capaces de emitir luz de color azul-verdoso, una propiedad no encontrada en cepas de *P. angustum*; no hay información disponible de la distribución de *P. angustum*, todas las cepas de esta especie han sido aisladas del océano abierto en el Archipiélago de Hawai.

Son bacilos rectos y delgados (0.8-1.3 μm de diámetro y 1.8-2.4 μm de longitud); Gram-negativos; mótils por 1-3 flagelos sin envoltura, algunos no son mótils; no forman endosporas o microcistos. Son bacterias anaerobias facultativas; quimio-organotróficas, poseen ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo; no desnitrifican; no fijan nitrógeno molecular; requieren iones de sodio para su crecimiento (160-280 mM es la concentración óptima).

La mayoría de las cepas crecen en medios minerales que contengan agua de mar, D-glucosa y NH_4Cl . Además todas utilizan D-manosa y glicerol. La reacción de oxidasa es variable; la mayoría de las cepas son lisina descarboxilasa y arginina dihidrolasa positivo, ornitina descarboxilasa negativo; acumulan poli- β -hidroxibutirato bajo ciertas condiciones de cultivo.

1.3.3. Descripción y propiedades metabólicas del género *Vibrio*

La mayoría de las especies de vibrios no requieren factores de crecimiento orgánicos. Algunas cepas, sin embargo, pueden desarrollar requerimientos de aminoácidos, particularmente después de almacenamientos prolongados y subcultivos (Lee *et al.*, 1978 *fide* Holt & Krieg, 1984).

Los vibrios crecen en una variedad de medios. La mayoría de las especies formarán colonias convexas, lisas, blancas-cremosas con bordes enteros. En algunas especies pueden darse algunas variantes en la morfología de las colonias particularmente después de repetidos cultivos y almacenamientos en medios más complejos. La temperatura óptima de crecimiento varía considerablemente, todas crecen a 20°C y la mayoría a 30°C.



El medio TCBS, originalmente fue formulado para el aislamiento del *V. parahaemolyticus*. (Kobayashi *et al.*, 1963 *fide* Holt & Krieg, 1984). Este medio selectivo es clásicamente utilizado en salud humana y fue adoptado en acuicultura. Sin embargo, más y más frecuentemente ciertas cepas de importancia médica no pueden ser aisladas con este medio debido a una especialización parasitaria, siendo las cepas más patógenas no cultivables *in vitro*, como el *V. cholerae* serotipo 01 (Colwell *et al.*, 1995). Podría ser que cepas de vibrios, patógenas del camarón e hiperespecializadas en este proceso de parasitismo, sean también difíciles de cultivar y aislar en medio TCBS. En este orden de ideas conviene recalcar que el número de vibrios aislados en gelosa no selectiva de tipo agar marino es generalmente superior al número de colonias, obtenidas a partir de la misma muestra, luego de aislamiento en TCBS.

Muchas cepas de vibrios marinos son capaces de esparcirse en medios sólidos, estando este fenómeno relacionado con la formación de células largas con muchos flagelos laterales y con parámetros físico-químicos, tales como la concentración del agar, la complejidad del medio o la temperatura (Baumann & Baumann, 1977 *fide* Holt & Krieg, 1984).

Algunas cepas de *Vibrio cholerae*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fisheri* y *V. logei* son luminiscentes, estando esta característica relacionada con la presencia de la enzima luciferasa (Holt & Krieg, 1984).

Los miembros de este género son bacilos rectos o curvos (0.5-0.8 μm de diámetro y 1.4-2.6 μm de longitud); Gram-negativos; mótils por uno o más flagelos polares encerrados en una envoltura; no forman endosporas o microcistos; son bacterias anaerobias facultativas; quimio-organotróficas, con ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo; no desnitrifican o fijan nitrógeno molecular; los iones de sodio estimulan su crecimiento y son necesarios para el crecimiento de la mayoría, la

concentración mínima necesaria para un crecimiento óptimo va de 5 a 700 mM; muchas especies de vibrios toleran condiciones alcalinas moderadas creciendo a pH de 9; la mayoría de las especies crecen bien en medios que contengan agua de mar. D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con producción de ácido, pero no de gas; oxidasa positivo.

Se los encuentra en ambientes acuáticos con amplios rangos de salinidades, pudiendo algunas especies también crecer en agua dulce. Muchas especies son patógenas para vertebrados y para invertebrados marinos.

1.4. PRINCIPIOS DE LA IDENTIFICACION BACTERIANA

La identificación de bacterias, previamente aisladas, consiste clásicamente en determinar una serie de características morfológicas y metabólicas cuya integración permite determinar su posición, por referencia a la taxonomía en curso. Es primordial considerar lo que representa la taxonomía bacteriana como sistema de clasificación arbitrario, simplista y estático frente a la extrema complejidad y variabilidad de estos microorganismos en perpetua y rápida evolución genética y consecuentemente fenotípica. En efecto, conviene recordar que hay una diversidad de procesos de modificación genética en bacterias, pudiendo todos estos fenómenos ser primordiales desde el punto de vista de la patogenicidad, que es el carácter esencial de la bacteriología en el cultivo de camarón. Así, la identificación morfológica y bioquímica aparece como la primera etapa necesaria para todo estudio de bacterias de camarón, pero ciertamente no suficiente. Otros criterios, antigénicos y genéticos deben en etapas posteriores ser investigados mediante inmunotecnologías y técnicas de biología molecular (Mialhe *et al.*, 1992).

1.4.1. Aislamiento de bacterias

Las metodologías utilizadas en bacteriología para el aislamiento están basadas en el uso de medios que satisfacen las necesidades fisiológicas más o menos específicas de un grupo de microorganismos considerados. Entre los medios clásicamente utilizados en bacteriología del camarón están TCBS, TSA y agar marino.

El principio del aislamiento consiste en dispersar bacterias en la superficie de una gelosa de manera que algunas de ellas sean separadas de las otras y luego al multiplicarse produzcan una colonia que corresponda a una sola bacteria.

Una técnica de aislamiento "streak plating" consiste en tomar una pequeña cantidad de la muestra con la punta de un asa de platino y sembrarla en una caja de Petri que contenga medio sólido, rayándola en forma de estrías de tal manera que se puedan obtener colonias aisladas (Fig.1). Otra técnica "pour plating" consiste en verter una gota o 0.1 ml de la muestra en la superficie del medio sólido y luego esparcirla por la superficie entera del medio con un varilla de vidrio estéril. Las placas inoculadas son incubadas a 28°C por 24 horas (Fig.2).

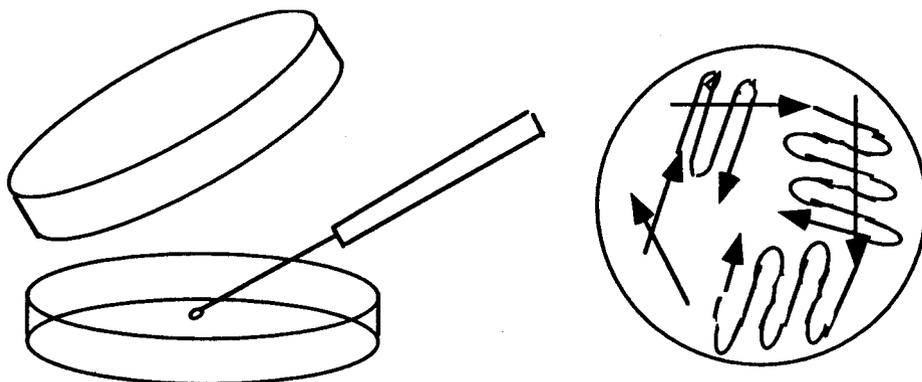


Figura 1.- Aislamiento de bacterias por rayado en estrías

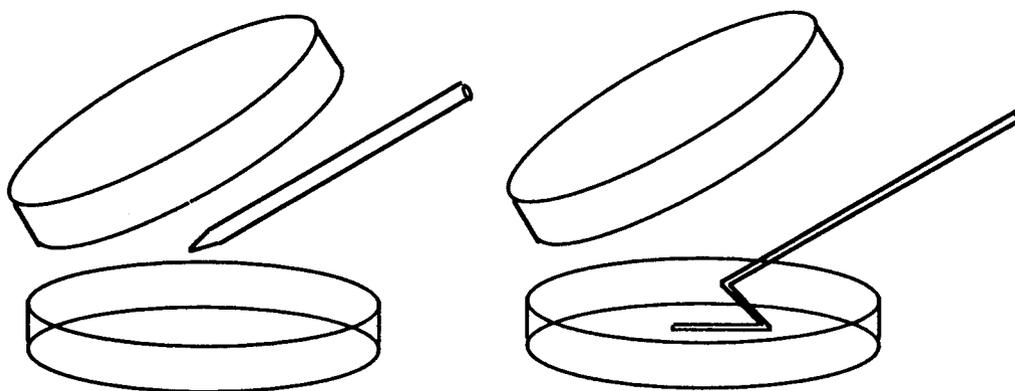


Figura 2.- Aislamiento de bacterias por esparcimiento.

1.4.2 Características fenotípicas usadas en identificación bacteriana

La extensa variedad bacteriana ha hecho necesario el uso de muchos criterios, esencialmente de tipo fenotípico, a fin de caracterizar e identificar cepas aisladas. Estos criterios corresponden a los diferentes grupos citados a continuación:

1. Morfología de la colonia
2. Morfología y dimensión celular
3. Citología celular (inclusiones de glicógeno y grasas).

4. Motilidad y distribución de flagelos
5. Presencia de esporas
6. Cápsulas
7. Tinción de Gram
8. Crecimiento en caldo
9. Crecimiento en agar
10. Formación de pigmentos
11. Crecimiento en gelatina
12. Crecimiento en leche
13. Crecimiento en medios selectivos
14. Requerimientos de oxígeno
15. Requerimientos de temperatura
16. Formación de productos de intercambio (sulfuro de hidrógeno, amoníaco, indol)
17. Reducción de nitratos y nitritos
18. Descomposición de grasas
19. Descomposición de almidones
20. Utilización de carbohidratos
21. Fuentes de nitrógeno
22. Vitaminas, antibióticos, etc.

En lo que concierne a bacterias asociadas al camarón pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Photobacterium* y *Vibrio* los criterios clásicamente utilizados son descritos en detalle a continuación:

Morfología de la colonia.- La forma y estructura de las colonias son características poco útiles para identificar especies debido a que bacterias de una misma especie pueden tener colonias distintas morfológicamente en función del estadio de crecimiento de la colonia, de las condiciones de incubación e incluso de las diferentes densidades de

inoculación. Al contrario bacterias muy diferentes desde el punto de vista taxonómico pueden tener colonias morfológicamente similares.

En función de las especies las colonias pueden ser grandes (más de 4- 5 mm), medianas (2-4 mm) o pequeñas (1-2 mm), con distintas formas, elevaciones y márgenes (Fig. 3).

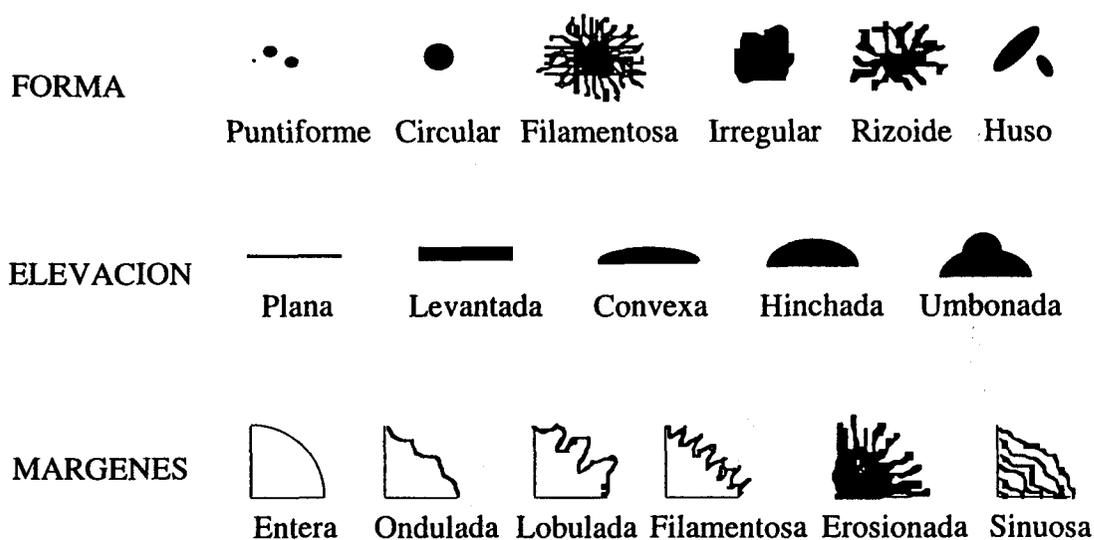


Figura 3.- Morfología de las colonias bacterianas

Morfología bacteriana.- Las características morfológicas usualmente consideradas corresponden a la forma de las células (cocos, bacilos rectos y curvos, espirales), sus extremos (extremos redondeados, de forma cuadrada, agudizados, cóncavos) su dimensión, el arreglo celular (células simples, pares, en cadena, filamentosas, pequeños paquetes) y a las características de los flagelos (número y disposición). Debido a que el secado puede causar deformaciones de la bacteria, es preferible examinarlas vivas al microscopio.

Motilidad. La motilidad está relacionada con la presencia de flagelos y puede ser estudiada por la técnica de la gota pendiente, usando la lámina excavada de Koch. El inóculo puede ser estudiado al microscopio compuesto en un cultivo bacteriano o una suspensión preparada extemporáneamente a partir de una colonia bacteriana.

Tinción de Gram. La diferencia entre bacterias negativas y positivas para la reacción de Gram es debida a la estructura de sus paredes celulares.

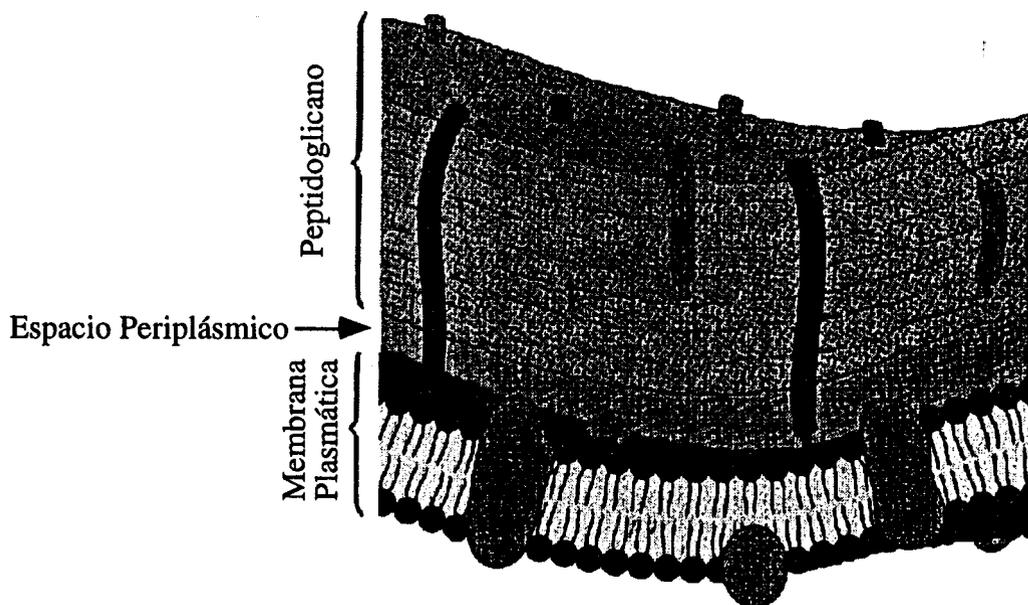


Figura 4.- Pared celular de una bacteria Gram positiva

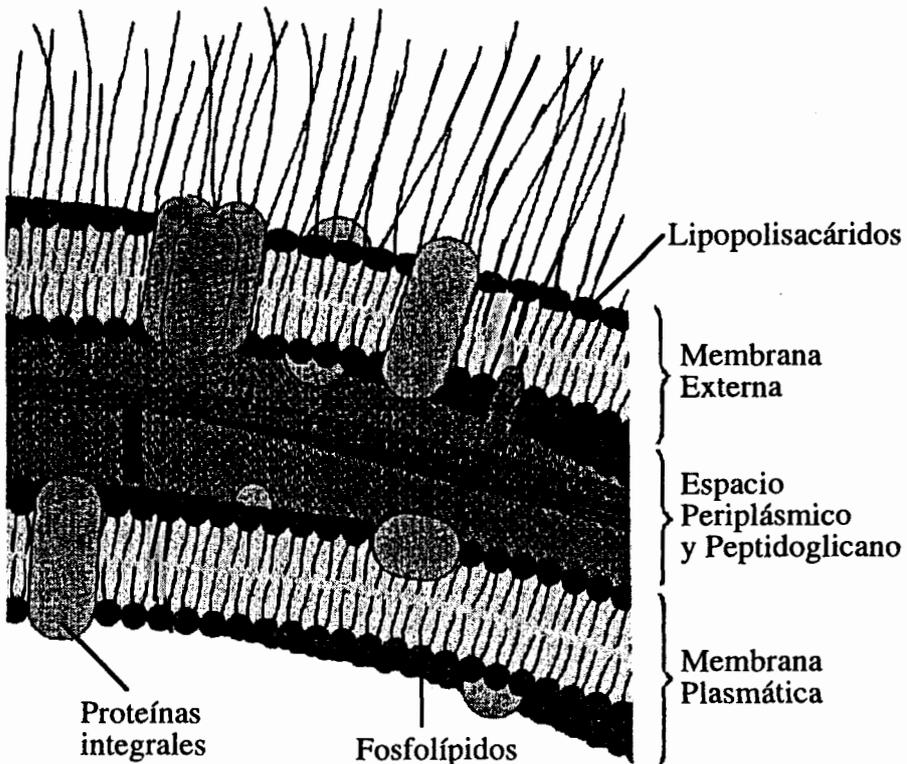
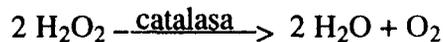


Figura 5.- Pared celular de una bacteria Gram negativa

Según esta prueba, las bacterias primero son teñidas con cristal violeta y luego tratadas con yodo para promover la retención del tinte. Una bacteria Gram-positiva (Fig.4) prácticamente no es decolorada con etanol debido a que éste disminuye el diámetro de los poros de la capa de peptidoglicano. Consecuentemente el complejo cristal violeta-yodo es retenido, lo que hace que la bacteria conserve su coloración púrpura sin cambio luego de la coloración con la safranina.

Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las bacterias Gram-negativas (Fig.5) es muy fina y tiene poros más grandes por lo que el alcohol remueve más rápidamente el complejo cristal violeta-yodo permitiéndoles ser teñidas posteriormente por la safranina.

Catalasa.- Ciertas bacterias contienen la enzima catalasa que interviene en la catálisis del peróxido de hidrógeno. Esta actividad es puesta en evidencia cuando se mezcla un inóculo bacteriano con una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la producción subsecuente de burbujas de oxígeno liberado.



Oxidasa.- Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima citocromo *c* oxidasa y puede ser fácilmente realizada mediante el uso de un producto comercial que corresponde a un papel impregnado con el reactivo tetrametil-p-fenil diamina HCL al 1% en solución acuosa. La prueba consiste en frotar el asa con el inóculo sobre el papel, la formación de un color violeta fuerte al instante debido a la oxidación del reactivo indica un resultado positivo, donde los electrones son transferidos desde el reactivo al citocromo *c*, y por lo tanto vía citocromo *c* oxidasa al oxígeno molecular. Se recomienda el uso del asa de platino debido a que la de níquel-cromada puede dar un resultado falso positivo.

Requerimiento y tolerancia de NaCl.- Esta prueba se la realiza en caldo nutritivo, conveniente para los microorganismos que no tienen requerimientos nutricionales específicos, suplementado o no con cloruro de sodio permitiendo determinar los requerimientos y tolerancias de sal de las bacterias.

Tipo de Metabolismo.- Los microorganismos Gram-negativos pueden ser diferenciados en base de su metabolismo oxidativo y/o fermentativo de carbohidratos. Para realizar esta prueba se necesitan dos tubos, uno cubierto de aceite mineral a fin de crear una condición anaerobia (fermentación) y el otro sin aceite, correspondiente a la condición aeróbica (oxidación). Los microorganismos estrictamente oxidativos crecen y producen solamente en el medio sin aceite mineral una acidificación que ocasiona un cambio del indicador de pH. Los microorganismos oxido-fermentativos producirán

acidificación en ambas condiciones. Si el carbohidrato no puede ser utilizado por la bacteria, no hay acidificación bajo ninguna condición.

Producción de indol.- La capacidad de una bacteria de producir indol es examinada utilizando el caldo de triptona. La triptona es el producto de la digestión pancreática de la caseína y es usada como fuente de nitrógeno, en particular el triptófano está presente en el medio en alta concentración. La utilización de triptófano por ciertos microorganismos conduce a la producción de indol puesto en evidencia por la adición del reactivo de Kovac (Fig. 6).

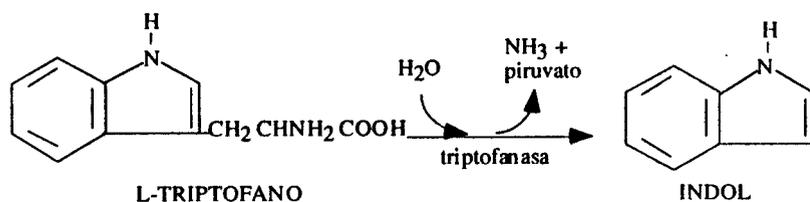


Figura 6.- Producción de indol por microorganismos a partir del triptófano

Reacción de Voges-Proskauer.- Esta reacción corresponde a la capacidad de ciertas bacterias de producir un producto final neutro de la fermentación de la dextrosa, la acetofna (acetilmetilcarbinol). La acetofna es oxidada en presencia de oxígeno y álcali (hidróxido de potasio) para producir diacetil (dimetilglioxal), el cual reacciona con el alfa-naftol para producir un color rojo o rosado en el medio MR-VP (Methyl red-Voges Proskauer). Esta es una reacción VP positiva.

Citrato de Simmons.- Los microorganismos, capaces de utilizar fosfato dihidrogeno de amonio y citrato de sodio como fuentes únicas de nitrógeno y carbón respectivamente, pueden crecer en el medio Citrato de Simmons provocando su alcalinización y subsecuentemente un cambio de color del indicador de pH, el azul de bromotimol, de verde (neutro) a azul (alcalino).

Ornitina descarboxilasa y Arginina dihidrolasa.- El medio "decarboxylase base Möeller" es usado para probar la producción de arginina dihidrolasa y ornitina descarboxilasa. Este medio contiene peptona y extracto de carne para proveer los nutrientes nitrogenados, piridoxal como co-factor enzimático para la enzima específica del aminoácido, dextrosa como carbohidrato fermentable y finalmente púrpura de bromo cresol y rojo cresol como indicadores de pH. Los aminoácidos, arginina u ornitina, son agregados en este medio para detectar la actividad de las enzimas específicas de las bacterias para estos substratos. Se deposita aceite mineral en los tubos para garantizar la fermentación.

La capacidad de una bacteria de fermentar dextrosa con acidificación del medio se traduce por un cambio de color de púrpura a amarillo. Esta acidificación estimula la descarboxilasa bacteriana, si está presente. La descarboxilación del aminoácido conduce a la producción de una amina con alcalinización del medio que cambia de amarillo a púrpura o violeta.

La arginina es hidrolizada por la arginina deiminasa para formar citrulina (Fig.7) y la ornitina es descarboxilada para formar putrescina (Fig.8).

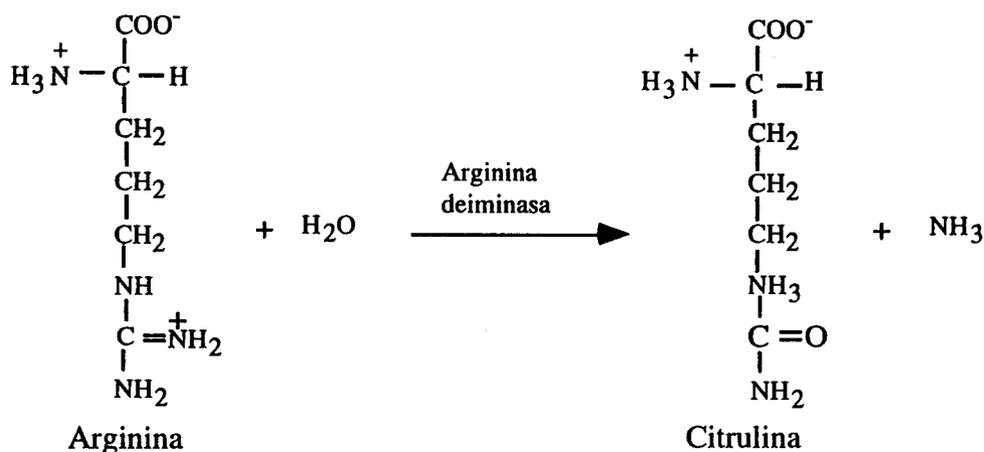


Figura 7.- Hidrolización de la arginina

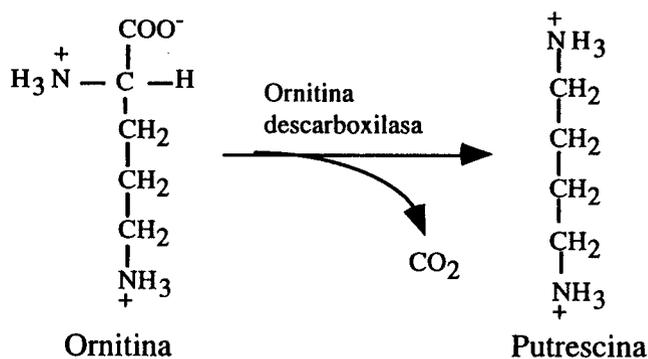


Figura 8.- Descarboxilación de la ornitina

Asimilación de carbohidratos.- La asimilación oxidativa de carbohidratos es muy utilizada como criterio de identificación bacteriana, esta prueba está basada en la utilización de un medio de cultivo complementado con un solo carbohidrato como fuente de carbono. Los carbohidratos son agregados al medio (1%) ya sea en polvo si el azúcar no se degrada con el autoclave o sea en solución previamente esterilizada por filtración. La oxidación del carbohidrato se traduce en la acidificación con cambio de color del indicador de pH.

1.5. SISTEMAS DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA

Clásicamente la identificación bioquímica requiere utilizar series de tubos con diferentes medios, lo que causa problemas en términos de preparación de medios y de manipulación de tubos para realizar las diferentes pruebas. En bacteriología médica una solución a estos problemas ha consistido en el desarrollo de "Kits" listos para usar y que tienen los criterios bioquímicos necesarios y suficientes para identificar bacterias patógenas al hombre.

Existen "kits" que se diferencian por el tipo de soporte de los medios, estos pueden ser impregnados en papel filtro o repartidos desecados en sistemas de micropozos plásticos. Sin importar el tipo de soporte, la rehidratación del medio es hecha por adición de la suspensión bacteriana. Cada característica bioquímica será determinada luego de uno o dos días de cultivo, generalmente en base al cambio de coloración, ya sea directamente o luego de la adición de reactivos.

Entre los "kits" de identificación más conocidos por su utilización en bacteriología médica, el sistema API 20E (API® Laboratory Products) merece ser citado porque es utilizado para identificaciones de bacterias asociadas a camarones. Este fue diseñado originalmente para la identificación de bacterias humanas de la familia *Enterobacteriaceae*. y permite realizar 20 pruebas bioquímicas: β -galactosidasa, arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, utilización de citrato, producción de sulfuro de hidrógeno, producción de ureasa, triptófano deaminasa, producción de indol, reacción de Voges-Proskauer, hidrólisis de la gelatina, fermentación de glucosa, asimilación de manitol, inositol, sorbitol, rhamnosa, sucrosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa. La prueba de oxidasa es hecha aparte. Después de 24 a 48 horas de cultivo, los resultados son determinados como positivos o negativos en base al cambio de coloración. Las reacciones son codificadas a fin de determinar un número de código de 7 dígitos que

permite determinar la especie bacteriana esto por referencia a una lista de números de códigos.

Otro "kit" que ha sido utilizado en bacteriología de camarón es el sistema miniaturizado TTE-AS (Flow Laboratories) que fue evaluado por Kampf *et al.* (1987) para la identificación de los miembros de la familia *Vibrionaceae* de importancia médica (10 especies de *Vibrio*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*). Este "kit" permite realizar 24 pruebas que son: triptófano deaminasa, producción de H₂S, hidrólisis de esculin, producción de indol, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, utilización de citrato y malonato, Voges-Proskauer, ureasa, fermentación de glucosa, sucrosa, rhamnosa, inositol, sorbitol, adonitol, xilosa y producción de β -galactosidasa, β -glucuronidasa y β -xilosidasa.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas bacterianas

E22	(<i>Vibrio harveyi</i>)
ILI	(<i>Vibrio alginolyticus</i>)
158	(<i>Vibrio alginolyticus</i>)
B668B	(<i>Pseudomonas</i> sp.)
B743Hm	(<i>Vibrio alginolyticus</i>)
B732Bt	(<i>Vibrio harveyi</i>)
B754T	(<i>Vibrio anguillarum</i>)
B707HL1	(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)
B747D	(<i>Vibrio damsela</i>)
B778C	(<i>Vibrio splendidus</i> II)
V. fluvialis	(<i>Vibrio fluvialis</i>)

La cepa E22 fue aislada en un laboratorio de larvas de camarón en la península de Santa Elena e identificada bioquímicamente como *V. harveyi* en CENAIM por Jenny Arauz en 1994.

La cepa ILI fue aislada por Iliana Morales en 1994 en el laboratorio de larvas de camarón EBISA de una muestra de agua de mar y fue identificada como *V. alginolyticus*.

La cepa 158 fue aislada de tanques de producción de larvas de camarón del laboratorio EBISA en 1995, y así mismo fue identificada bioquímicamente como *V. alginolyticus*.

Las cepas B668B, B743Hm, B732Bt, B754T, B707HL1, *V. fluvialis*, B 747D y B778C fueron aisladas e identificadas bioquímicamente en CENAIM.

2.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS

Los procedimientos de aislamiento en microbiología consisten en obtener una colonia pura proveniente de un solo microorganismo. Para aislar una bacteria, se hacen diluciones de la muestra y se siembran 100 μ l en agar marino y TCBS esparciéndolos con una varilla de vidrio estéril. Una vez obtenidas colonias aisladas son transferidas a TSA (medio recomendado para realizar pruebas bioquímicas) tomando una pequeña cantidad de la colonia deseada con la punta de un asa de platino y luego sembradas en el medio sólido rayando en forma de estrías. La siembra en estrías se realiza por agotamiento, de tal manera que se puedan obtener colonias aisladas.

Cuando se trabaja con cepas aisladas congeladas, se las siembra directamente en TSA. En todos los casos las placas son incubadas a 28°C por 24 horas.

Siempre hay que tener presente que es indispensable el mantenimiento de condiciones asépticas durante todos los pasos de esta operación, para lo cual es necesario trabajar en una cámara de flujo laminar (Air Tech Japan,Ltd. Mod. BCM-1002W).

2.2.1. Medios de aislamiento

TCBS (DIFCO®). Es un medio selectivo para vibrios, no debe ser autoclavado, por lo tanto, es importante trabajar con materiales completamente estériles.

Agar Marino (DIFCO®). Es un medio específico para bacterias marinas, en el cual pueden crecer distintas especies. Este agar tiene la característica de no ser muy duro al solidificarse, por lo que es necesario agregar 0.5 a 0.85% de bacto - agar.

TSA (ACUMEDIA_{TM}). Es un medio general que permite el crecimiento de distintas especies bacterianas y es recomendado para el aislamiento y purificación de bacterias antes de realizar pruebas de identificación bioquímica.

2.3. TECNICA CLASICA DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA

2.3.1. Siembra de bacterias para identificación bioquímica

La forma de sembrar las bacterias en los diferentes medios para una bioquímica dependerá del tipo de medio. Para la inoculación en medios líquidos primero se hace una suspensión bacteriana en agua destilada para la prueba de crecimiento al 0% de NaCl y en solución salina estéril 0.85% de NaCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para el resto de las pruebas, tomando con un asa de platino cierta cantidad de la colonia bacteriana sembrada en agar y diluyéndola. La colonia bacteriana preferiblemente debe haber sido sembrada en un agar general (TSA, BHI, NA). El uso de agares selectivos, que contienen carbohidratos o los que son elaborados con agua de mar causan falsas reacciones en algunas de las pruebas bioquímicas, haciendo difícil la identificación del organismo.

Una vez realizada la suspensión bacteriana tomar 0.5 ml de la misma e inocularla en cada uno de los medios a usarse, para el medio citrato de Simmons (sólido) la inoculación se la hace tomando una pequeña cantidad de la colonia bacteriana con un asa de platino en forma de aguja y sembrándola sobre la superficie del medio, haciendo una línea recta y luego sobre la misma un estriado.

2.3.2. Pruebas morfológicas

Motilidad y forma

Se coloca una gota pequeña de la suspensión bacteriana en la centro de una lámina cubreobjeto con un asa en punta. Previamente se prepara una lámina excavada de Koch, poniendo una capa de vaselina alrededor de la concavidad. Luego se coloca cuidadosamente la lámina cubreobjeto sobre la concavidad, de tal forma que la gota cuelgue libremente del cubreobjeto sin tocar los lados ni el fondo de la lámina de Koch, presionando ligeramente el cubre-objeto sobre la lámina.

Se coloca una gota de aceite de inmersión directamente sobre la superficie del cubre-objeto para examinar el cultivo al microscopio (100X) con el objetivo de inmersión. Observándose la motilidad y forma. El inóculo debe ser tomado de cultivos líquidos jóvenes.

Tinción de Gram

Tomar un inóculo de bacteria y colocarlo en una placa portaobjeto que contenga una gota de agua destilada o agua de mar estéril, según el origen de la bacteria, mezclándolo bien y dejándolo secar al aire libre, pasar después la placa sobre una flama hasta que la muestra quede fijada. Cada exposición a la flama no debe ser mayor a 2 segundos.

Una vez fijada la muestra, cubrir el frotis con "Gram Cristal Violeta" (BACTO®) por un minuto, enjuagar con chorro fino de agua, cubrir el frotis con "Gram iodine mordant" (BACTO®) por un minuto y enjuagarlo con chorro fino de agua. El siguiente

coloración azul, enjuagar suavemente y cubrir el frotis con "Gram safranina" (BACTO®) por dos minutos, enjuagar y dejar secar. Observar al microscopio usando aceite de inmersión y con el objetivo de 100 X. La coloración azul o violeta indica que la bacteria es Gram positiva y si la coloración es rosada, esta es Gram negativa.

Método de Ryus : Es otra técnica para determinar si una bacteria es Gram-negativa o Gram-positiva, consiste en tomar un inóculo de bacteria con un asa de platino en punta y ponerlo en contacto con hidróxido de potasio (KOH) al 3%. Si se forma un hilo al levantar el asa, la bacteria es Gram-negativa, caso contrario es Gram-positiva (Finegold, 1989).

2.3.3. Pruebas bioquímicas

Catalasa

Con un asa de níquel-cromada se toma un inóculo bacteriano y se lo pone en contacto con una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), si se producen burbujas la prueba es positiva.

Oxidasa

Con un asa de platino se toma un inóculo bacteriano y se lo frota en papel impregnado con el reactivo (cytochrome-oxidase reagent "Nissui", Yaku Code 05180), previamente humedecido con agua destilada. El desarrollo de un color violeta al instante o dentro de un minuto significa un resultado positivo.

Crecimiento al 0% NaCl

Inocular un tubo conteniendo 5 ml del medio NB (BACTO®) con la suspensión bacteriana, incubarlo a 28°C hasta 4 días, si el medio se torna turbio la prueba es positiva, si permanece igual es negativa (Foto 1).

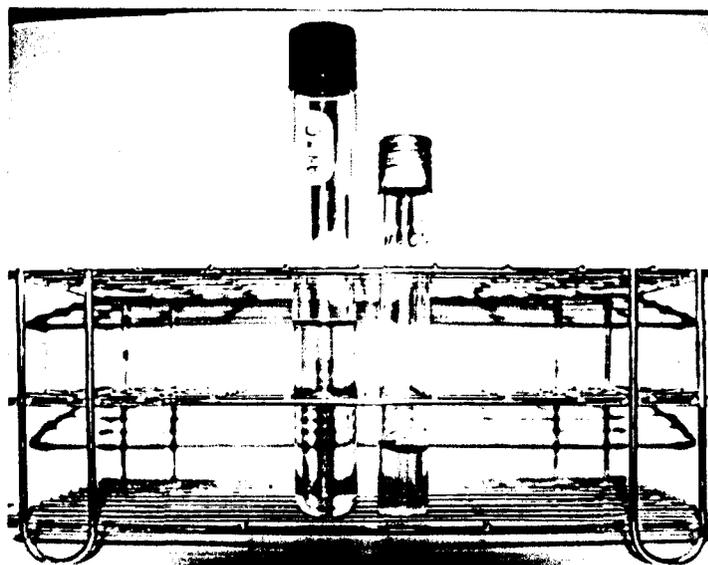


Foto 1. Prueba de crecimiento al 0% de NaCl

Tipo de metabolismo

Inocular dos tubos con 5 ml del medio Basal O-F (BACTO®) suplementado con 1% del carbohidrato D(+) Glucosa (SIGMA®) para probar cada organismo. Cubrir uno de los tubos con 1 ml de aceite mineral (LabGuard®).

Colocarlos en la incubadora (Sibata Scientific Technology Ltd. Modelo SI-450) a 28°C por 24 horas o más. La formación de ácido (amarillo) solo en el tubo abierto indica utilización oxidativa de la glucosa. La formación de ácido en ambos tubos indica una reacción fermentativa. Si no se produce ninguna reacción ácida, significa que la bacteria

no utiliza la glucosa por ningún método (Foto 2).

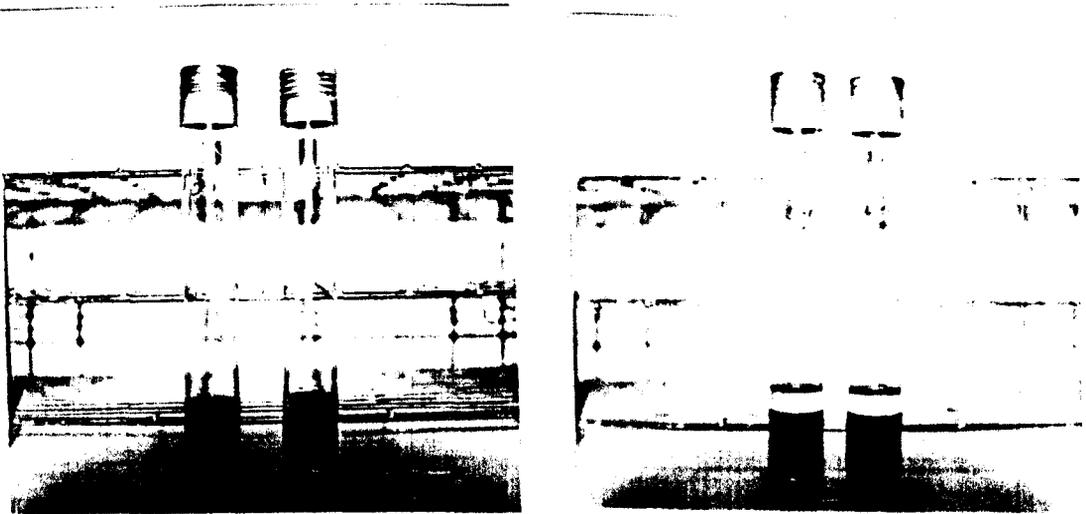


Foto 2. Prueba para determinar el tipo de metabolismo

Producción de indol

Inocular un tubo con 5 ml de triptona (BACTO®) al 1% estéril con la bacteria, incubarlo a 28°C por 24 horas o más, hasta observar crecimiento. Adicionar 0.5 ml del reactivo de Kovac, agitándolo suavemente. Si se desarrolla un color rojo fuerte en la capa de la superficie inmediatamente o después de unos pocos minutos, el resultado es positivo.

Reactivo de Kovac: Disolver 5 g de P-dimetilaminobenzaldehído en 75 ml de alcohol amílico, agregar lentamente 25 ml de ácido clorhídrico concentrado (Foto 3).

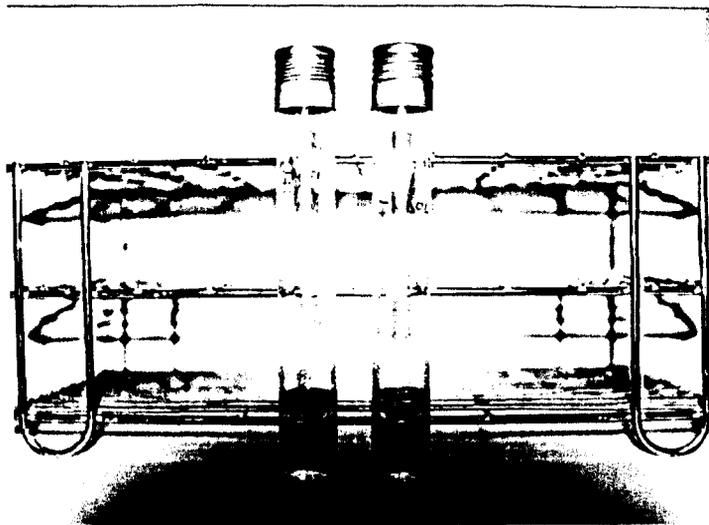


Foto 3. Prueba de producción de indol

Reacción de Voges-Proskauer

Inocular un tubo con 5 ml del caldo MR-VP (BACTO®) , con la bacteria a identificar, incubarlo a 28°C por 24 horas o más, hasta observar crecimiento.

A 1 ml del medio incubado adicionar 0.6 ml de la solución 1 (alfa naftol al 5% en etanol absoluto) y 0.2 ml de la solución 2 (solución de hidróxido de potasio al 40%), agitar bien después de haber añadido cada solución. El desarrollo de un color rojo indica que la prueba es positiva. Reacciones positivas ocurren inmediatamente o después de 5 minutos de haber añadido el segundo reactivo, es preferible leer los resultados después de 4 horas (Foto 4).

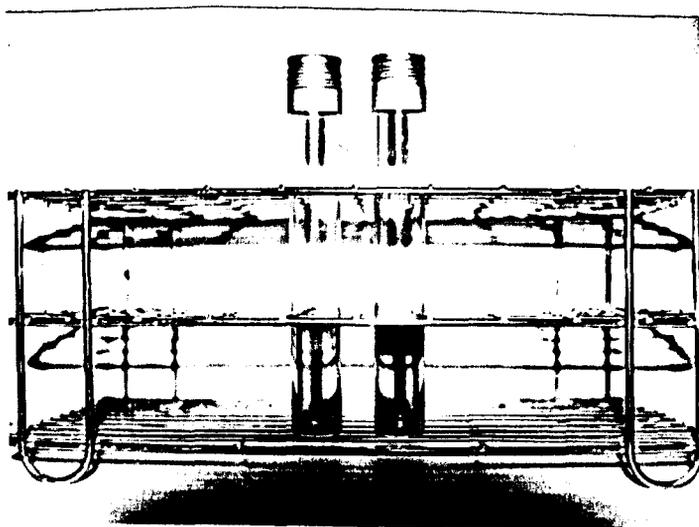


Foto 4. Prueba de Voges-Proskauer

Citrato de Simmons

Sembrar la bacteria en un tubo con 5 ml del medio citrato de Simmons (BACTO®) en la superficie del agar inclinado con un asa en punta, incubar a 28°C por 24 a 48 horas o hasta 4 días en condiciones aerobias. Una reacción positiva es indicada por el desarrollo con un color azul intenso. Reacción negativa si no hay cambio de color (el medio permanece verde oscuro).

Ornitina descarboxilasa y Arginina dihidrolasa

Inocular 5 ml del medio "Decarboxilase base Moeller" (BACTO®) suplementado con el 1% del aminoácido correspondiente : L - Arginine monohydrochloride, L-Ornithine hydrochloride (WACO PURE CHEMICAL INDUSTRIES Ltd.). Cubrir los tubos con 1 ml de aceite mineral estéril e incubarlos a 28 °C por 24 a 96 horas. La reacción resultante producirá alcalinización (púrpura o violeta) para las bacterias que producen descarboxilasa y un pH ácido (amarillo) para las bacterias que no producen

descarboxilasa. El color de los tubos positivos pueden variar en tonos fuertes y suaves debido a una destrucción parcial del indicador por parte de algunas bacterias. Los tubos negativos siempre tendrán un amarillo definido (Foto 5).

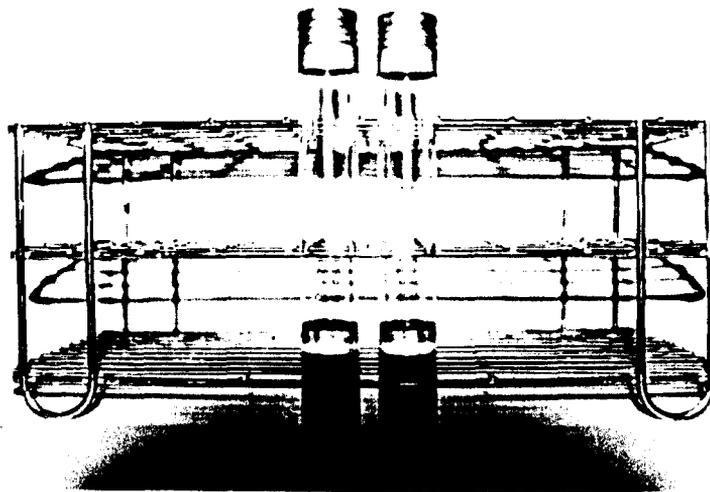


Foto 5. Prueba para la detección de enzimas específicas a aminoácidos

Asimilación de carbohidratos.

Preparar tubos que contengan individualmente 5 ml del medio basal O-F con los diferentes tipos de carbohidratos a utilizarse al 1%: L(+) Arabinose (SIGMA®), D(+) Cellobiose (SIGMA®), D(+) Mannose (OR® Mallinckrodt), Mannitol (J.T. Baker®), Sucrose (J.T. Baker®), D-Glucuronic acid lactone (SIGMA®), D-Gluconic acid lactone (SIGMA®), D(+) Galactose (SIGMA®).

Inocular los tubos con la suspensión bacteriana y luego incubarlos a 28°C hasta 4 días. Observar la reacción diariamente, si se produce un cambio de color a amarillo indica que la bacteria ha oxidado el carbohidrato que contiene el medio (Foto 6).

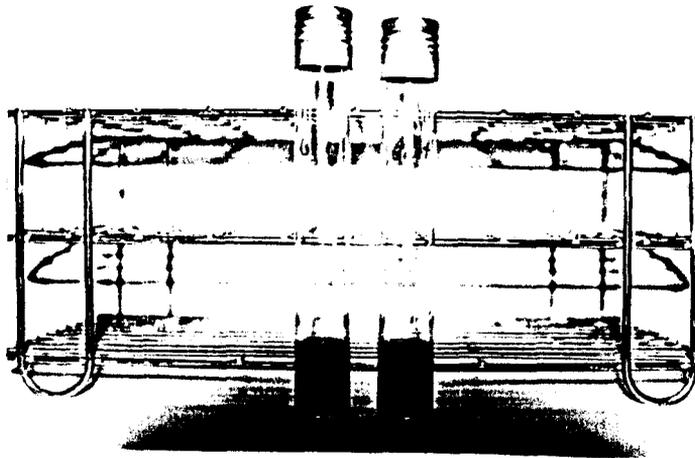


Foto 6. Prueba de asimilación de carbohidratos

NOTA.- A todos los medios se les debe ajustar la concentración de NaCl al 2%.

2.4. LECTURA DE LOS RESULTADOS

Es posible usar tablas de diagnóstico en forma conjunta con computadoras. Las tablas son incorporadas a la memoria de la computadora y los resultados de aislados desconocidos son comparados con cada una de las posibilidades, la correlación más alta es tomada para inferir una identificación (Austin, 1988). El análisis "cluster" del paquete STATISTICA es usado para este propósito (Austin, comunicación personal).

En el análisis "cluster" se calculan los índices de similitudes entre la información de referencia y el aislado desconocido. Dentro de este análisis se utiliza la opción de joining (tree clustering), el cual une objetos en grandes racimos, usando alguna medida de similitud o distancia.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. BACTERIAS SELECCIONADAS ASOCIADAS A CAMARON

De todas las especies bacterianas conocidas como asociadas al camarón, se escogieron las que según la bibliografía eran las predominantes y además implicadas como patógenas para distintas especies de camarones peneidos:

Pseudomonadaceae

Pseudomonas spp.

Vibrionaceae

Aeromonas spp.

Photobacterium spp.

***Vibrios* spp:**

V. alginolyticus

V. anguillarum

V. campbelli

V. cholerae

V. damsela

V. fischeri

V. fluvialis

V. furnissii

V. harveyi

V. hollisae

V. logei

V. marinus

V. nereis

V. parahaemolyticus

V. pelagius

V. penaeicida

V. splendidus I.

V. splendidus II.

V. tubiashii

V. vulnificus

3.2. PRUEBAS ESCOGIDAS

Basado en un análisis bibliográfico exhaustivo se escogieron un total de 21 pruebas entre morfológicas y bioquímicas, las cuales fueron seleccionadas por ser las necesarias y suficientes para poder identificar y diferenciar las bacterias seleccionadas (Tablas 3 y 4).

Estas pruebas son: Forma celular, motilidad, reacción de Gram, oxidasa, catalasa, crecimiento 0% NaCl, O-F (oxidativo y fermentativo), producción de indol, reacción de Voges-Proskauer, citrato de Simmons, ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, asimilación de L-arabinosa, celobiosa, D-manosa, D-manitol, sucrosa, D-glucuronato, D-gluconato, D-galactosa (Tabla 3).

Las pruebas de forma celular, motilidad, reacción de Gram, oxidasa y catalasa son importantes para la identificación a nivel de los géneros seleccionados, mas no para la diferenciación de las bacterias escogidas, ya que todas ellas poseen las mismas características: Bacilos mótiles, Gram negativos, oxidasa y catalasa positivo.

La prueba de crecimiento al 0% de NaCl es importante para diferenciar *Pseudomonas* spp. y *Aeromonas* spp. de las otras, excepto de *V. cholerae* y *V. furnissii* (Tabla 4).

Tabla 3.- Pruebas útiles para diferenciar bacilos móviles, Gram negativos, Oxidasa y Catalasa positivos

	Pseu.	Aero.	Photo.	V. alg	V. ang	V. cam	V. cho	V. dam	V. fis	V. flu	V. fur	V. har	V. hol	V. log	V. mar	V. ner	V. par	V. pel	V. pen.	V. spl I	V. spl II	V. tub	V. vul		
1 Crecimiento 0% CINA	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2 OF(oxidativo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3 OF (fermentativo)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4 Produccion de indol	-	d	(+)	+	-	+	-	(-)	+	+	(-)	+	+	+	-	+	-	d	+	+	+	+	+	+	
5 Voges-Proskauer	d	d	+	+	d	d	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6 Citrato,Simmons	d	d	-	+	d	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	d	+	+	+	+	d	
7 Ornitina descarboxilasa	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8 Arginina dihidrolasa	d	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	d	
ASIMILACION DE:																									
9 L-Arabinosa	d	d	-	+	-	-	-	-	-	+	+	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 Celobiosa	d	d	-	+	d	-	-	+	+	d	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+
11 D-Manosa	d	d	+	d	d	d	+	+	+	+	d	+	+	d	-	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+
12 D-Manitol	d	d	-	+	d	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
13 Sucrosa	d	d	d	+	+	+	-	+	+	+	+	d	-	-	+	+	-	d	-	d	-	+	+	+	-
14 D-Glucuronato			d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
15 D-Gluconato			d	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+
16 D-Galactosa			+	+	d	-	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

+ (90% o más positivo)

- (90% o menos negativo)

d (11-89% positivo)

(+) 76-89% positivo

(-) 11-25% negativo



POLITECNICA DEL VALENCIA

BIBLIOTECA
CENTRAL

Tabla 4.- Pruebas que diferencian los géneros de Pseudomonas, Aeromonas, Photobacterium y Vibrios, y especies de Vibrios

	Aeromonas	Photobacterium	Vibrio			
Pseu.	3	1,3	1,3			
Aero.		1	1			
Photo.			7,8,11,12			
	V. alginolyticus	V. anguillarum	V. campbelli	V. cholera	V. damsela	V. fisheri
V. ang.	6,8,9,10					
V. cam.	13,15	4,8,9,13,15				
V. cho.	1,6,15	1,7,8,9,10,15	1,4,7,13,16			
V. dam.	8,12,13,15	4,6,9,10,12,13,15	8,16	1,4,6,7,8,12,13		
V. fis.	5,10,13,15	4,5,8,9,13,15	16	1,4,7,10,13	5,8,10,12	
V. flu.	5,6,8,9	5	8,9,13,15,16	1,7,8,9,15	5,6,9,12,13,15	8,9,13,15
V. fur.	1,5,6,8,9	1,5,10	1,8,9,13,15,16	7,8,9,15	1,5,6,9,12,13,15	1,8,9,10,13,15
V. har.	10,14	6,8,14	4,14,15	1,6,7,10,14,15	4,8,10,12,14,15	4,14,15
V. hol.	5,9,12,13	5,6,8,10,12,13	4,9,16	1,6,7,9,12,13	4,5,8,9	4,9, 10,12
V. log.	5,10,13	5,6,8,9,13	15,16	1,6,7,10,13,15	5,8,10,12,15	15
V. mar.	5,12,13	4,5,6,8,9,10,11,12,13	15,16	1,4,6,7,12,13,15	5,8,11,15	10,11,12,15
V. ner.	5,6,8,12	4,5,9,10,11,12	8,13,15	1,4,7,8,12,15,16	5,6,11,13,15,16	8,10,11,12,13,15,16
V. par.	5,13	5,6,7,8,10,13	4,7,15,16	1,6,13,15	4,5,7,8,12,15	4,7,10,15
V. pel.	5,6	4,5,8,9,10	15,16	1,4,7,15	5,6,8,12,15	10,15
V. pen.	5,10,12,13	5,8,9,12,13	lisina	1,7,10,12,13,16	8,10,16	12,16
V. sple. I	5,6,8,10,14	5,9,14	4,8,14,16	1,7,8,10,14	4,5,6,10,12,14	4,8,14
V. sple. II	5,6,13,15	8,9,11,13,15	4	1,7,13,16	4,5,6,8,11,12,16	4,17,16
V. tub.	5,6,10	5,9	13,15,16	1,7,10,15	5,6,10,12,13,15	13,15
V. vul.	5,10,13,14	5,8,9,13,14	4,14,15,16	1,10,13,14,15	4,5,8,10,14,15	4,14,15
	V. fluvialis	V. furnissi	V. harveyi	V. hollisae	V. logei	V. marinus
V. fur.	1					
V. har.	6,8	1,6,8,10,14				
V. hol.	6,8,12,13	1,6,8,12,13	10,12			
V. log.	6,8,9,13	1,6,8,9,10,13	14	9,10,12		
V. mar.	6,8,9,11,12,13	1,6,8,9,12,13	4,10,11,12,14	4,9,11	10,12	
V. ner.	9,11,12,16	1,9,12,16	4,6,8,10,11,12,14	4,6,8,9,11,13,16	6,8,10,12,13,16	6,8,13,16
V. par.	6,7,8,13	1,6,7,8,13	7,10	7,12	7,10	4,7,11,12
V. pel.	8,9	1,8,9	4,6,10,14	4,6,9,12	6,10	6,12
V. pen.	8,9, 12,13,16	1,8,9,10,12,13,16	12,14	2,9,10,16	12,16	10,11,16
V. sple. I	9	1,9,10,14	6,8	6,8,9,10,12	6,8,14	4,6,8,10,11,12,14
V. sple. II	8,9,11,13,15,16	1,8,9,13,15,16	6,11,14,15	6,9,11,12,16	6,15,16	4,6,10,12,15,16
V. tub.	9	1,9,10	6,14	6,9,10,12,13	6,13	6,10,11,12,13
V. vul.	8,9,13	1,8,9,10,13,14	mot	9,10	14	4,10,11,14
	V. nereis	V. parahaemolyticus	V. pelagicus	V. penaeicida	V. splendidus I	V. splendidus II
V. par.	4,6,7,8,11,12,13,16					
V. pel.	8,12,16	4,6,7				
V. pen.	8,10,11,13	7,10,12,16	10,12,16			
V. sple. I	4,10,11,12,14,16	6,7,8,10	4,8,19,14	8,12,14,16		
V. sple. II	4,8,12,13,15	6,7,11,15,16	4,15,16	11,12	8,11,14,16	
V. tub.	10,11,12,16	6,7,10,13	10	12,13,16	14	11,13,15,16
V. vul.	4,8,10,11,13,14,16	10	4,10,14	14,16	8	11,14,15,16
	V. tubiashi					
V. vul.	13,14					

La prueba del tipo de metabolismo bacterial (O-F) sirve para diferenciar *Pseudomonas* spp. de las otras, excepto de *V. hollisae* (Tabla 4).

Las pruebas ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, D-manosa, D-manitol y D-galactosa son importantes para diferenciar *Photobacterium* spp. de todas las especies de vibrios (Tabla 4).

Todas las pruebas sirven para diferenciar las distintas especies del género *Vibrio*.

3.3. ELABORACION DE PRUEBAS BIOQUIMICAS CON EL SISTEMA MINIATURIZADO TOMANDO COMO REFERENCIA A LA TECNICA CLASICA.

Las bases de el método miniaturizado (Foto 7) son las mismas que las de la técnica clásica de identificación bioquímica (Foto 8). La diferencia radica en los materiales y el volumen de los medios y reactivos usados.

La determinación de la forma celular, motilidad, oxidasa y catalasa se las realizó de igual forma que en el método clásico. Para conocer si las bacterias eran Gram negativo o Gram positivo se utilizó el método de Ryus (descrito en materiales y métodos), por ser más rápido que la tinción de Gram, aunque no tan confiable.

El resto de las pruebas seleccionadas (16) se las hizo en microplacas de 96 pozos (Corning. Cell Wells™).

Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en tubos de ensayo, colocando una asada de la colonia bacteriana en agua destilada estéril para la prueba de crecimiento al 0% de NaCl y en solución salina al 0.85% de NaCl para el resto de las pruebas.

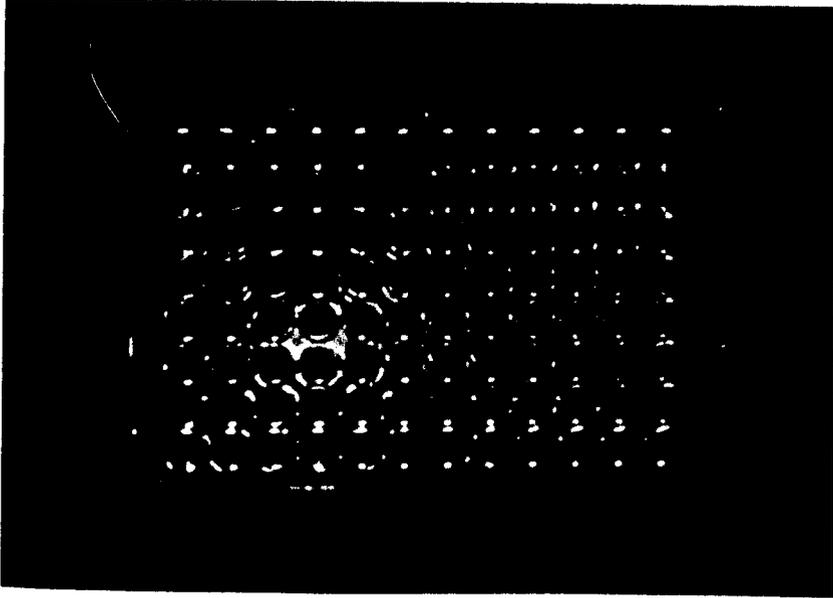


Foto 7. Técnica miniaturizada de identificación bioquímica

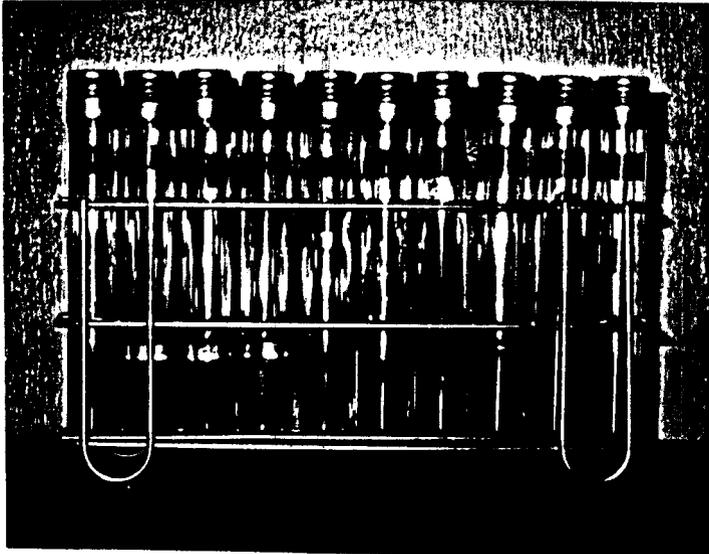


Foto 8. Técnica clásica de identificación bioquímica

Una vez sembradas las microplacas, estas fueron incubadas a 28°C, haciendo las lecturas a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.

Para cada prueba se utilizaron dos cepas bacterianas, una en la que se esperaba obtener un resultado positivo y en otra un resultado negativo, para de esta forma comprobar que se obtenían los mismos resultados tanto en la técnica clásica como en la miniaturizada para ambas posibilidades.

Los medios fueron colocados en la microplaca de tal forma que son utilizadas dos columnas de esta para identificar a una cepa, por lo tanto se pueden analizar hasta seis cepas por cada microplaca.

En el 100% de los casos se obtuvieron los mismos resultados con la metodología clásica y con la miniaturizada. Los resultados son mostrados en la tabla 5.

Crecimiento al 0% NaCl

A 200 µl del medio NB, se inocularon 20 µl de la suspensión bacteriana en agua destilada. La formación de turbidez en el medio indicaba un resultado positivo.

Se probaron las cepas B668B (positiva) y B743Hm (negativa). Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo.

Tipo de metabolismo

Se utilizaron dos pozos, en uno se determinó el metabolismo oxidativo, usando 200 μl del medio O-F suplementado con glucosa y en el otro se determinó el metabolismo fermentativo usando 150 μl del mismo medio. Se inocularon 20 μl de suspensión bacteriana a ambos pozos y al segundo se le añadió 100 μl de aceite mineral estéril, para garantizar una condición anaerobia.

La acidificación del medio con viraje del indicador de pH de verde a amarillo solo en el pozo abierto indicaba un resultado positivo para la utilización oxidativa de la glucosa, mientras que la acidificación del medio en ambos pozos indicaba un resultado positivo para la utilización oxido-fermentativa de la glucosa. Si no se produce acidificación en ninguno de los pozos significa que la bacteria no utiliza la glucosa de ninguna forma.

Se probaron las cepas B743Hm (positiva) y B668B (negativa) para la prueba fermentativa. Debido a que todas las cepas escogidas poseen metabolismo oxidativo, para esta prueba solo se trabajó con la cepa B743Hm. Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo.

Producción de indol

A 200 μl de triptona al 1% se inocularon 20 μl de la suspensión bacteriana, después de 1-3 días de incubación (cuando se notaba crecimiento) se adicionaron 20 μl del reactivo de Kovac mezclándolo directamente con la micropipeta. La aparición de un halo de color rosado o rojo en la superficie indicaba una respuesta positiva.

Se probaron las cepas B754T (positiva) y B668B (negativa). Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo.

Reacción de Voges - Proskauer

A 100 μ l del medio MR-VP se adicionaron 20 μ l de la suspensión bacteriana. Después de 1-3 días de incubación (cuando se notaba crecimiento) se adicionaron 60 μ l de la solución 1 y 20 μ l de la solución 2, mezclando con la micropipeta después de añadir cada solución.

La aparición de un color rojo indicaba que la prueba era positiva, esto ocurre inmediatamente o después de 5 minutos de haber añadido el segundo reactivo.

Inicialmente se probaron las cepas B743Hm (positiva) y B707HL1 (negativa), pero no hubo reacción positiva en ninguna. Luego se probaron las cepas B754T (positiva) y B732Bt (negativa), pero ambas dieron reacción positiva. Esto puede ser explicado a que pueden existir cepas mutantes de dicha especie, ya que el 10% de las cepas de una especie bacteriana no poseen las características de el resto para determinadas pruebas. Finalmente se usaron las cepas B754T (positiva) y B707HL1 (negativa). Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo.

Citrato de Simmons

A 200 μ l del medio citrato de Simmons se añadieron 20 μ l de la suspensión bacteriana. Una reacción positiva era indicada por el cambio de color del medio de verde a azul.

Al principio se probaron las cepas B754T (positiva) y B743Hm (negativa), pero ambas dieron reacción positiva debido a la existencia de cepas mutantes, como fue explicado anteriormente. Posteriormente se usaron las cepas B754T (positiva) y B668B (negativa). Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo.

Ornitina descarboxilasa

A 150 μ l del medio "bacto decarboxylase base Moeller" con el aminoácido ornitina, se adicionaron 20 μ l de suspensión bacteriana y 100 μ l de aceite mineral estéril. El desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil indicaba un resultado positivo, una coloración amarilla negativo.

Inicialmente se probaron las cepas B707HL1 (positiva) y B754T (negativa), pero ambas dieron una reacción negativa, por la misma razón mencionada anteriormente, por lo que posteriormente se usaron las cepas B732Bt (positiva) y B754T (negativa). Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo.

Arginina dihidrolasa

A 150 μ l del medio bacto decarboxylase base Moeller con el aminoácido arginina, se adicionaron 20 μ l de la suspensión bacteriana y 100 μ l de aceite mineral estéril. El

desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil indicaba un resultado positivo, una coloración amarilla negativo.

Se probaron las cepas B754T (positiva) y B732Bt (negativa). Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo.

Asimilación de carbohidratos

A 200 μ l del medio O-F con el carbohidrato apropiado, se añadieron 20 μ l de la suspensión bacteriana. Si el medio se tornaba amarillo la prueba era positiva, y negativa si permanecía verde o se volvía azul.

Los medios con carbohidratos, al principio fueron preparados por separado, obteniéndose ligeras diferencias en los tonos de las coloraciones debido al efecto de errores en el pesaje del medio O-F, debido a esto se preparó un stock del medio O-F para luego repartirlos en tubos y añadirles el carbohidrato correspondiente quedando todas del mismo tono.

Es importante recalcar que ciertos carbohidratos no pueden ser esterilizados en el autoclave (se desdoblán a esas temperaturas), sino por filtración, entre ellos arabinosa, celobiosa y sucrosa, además se recomienda esterilizar el resto de los carbohidratos utilizados a 110°C por 10 minutos.

Los resultados obtenidos en la microplaca fueron idénticos a las pruebas realizadas en los tubos de ensayo, para todos los carbohidratos utilizados.

L-Arabinosa. Se probaron las cepas B754T (positiva) y B743Hm (negativa), pero no hubo reacción positiva en ninguna debido a que el carbohidrato se degradó al ser autoclavado y por lo tanto no pudo ser asimilado. Luego se probaron las cepas V. fluvialis (positiva) y B743Bt (negativa), obteniéndose los resultados esperados.

Celobiosa. Se probaron las cepas B754T (positiva) y B743Hm (negativa), pero ambas dieron reacción positiva ya sea por contaminación o la presencia de cepas mutantes. Entonces se usaron las cepas B754T (positivas) y B668B (negativas), obteniéndose los resultados esperados.

D-Manosa. No se usaron cepas negativas debido a que no se contaban con aislados de las mismas, se probó la cepa B754T (positiva).

D-Manitol. Se probaron las cepas B754T (positiva) y B747D (negativa).

Sucrosa. Se probaron las cepas B754T (positiva) y B747D (negativa).

D-Glucuronato. Se probaron las cepas B732Bt (positiva) y B754T (negativa). Para la preparación de este medio se utilizó ácido D-glucurónico-Lactona, por lo que al preparar el medio este se tornaba ácido (amarillo), entonces se tuvo que ajustar el pH final a 7.2 con NaOH 1N y se lo estabilizó con hepes (5.2 gr/ lt).

D-Gluconato. Se probaron las cepas B743Hm (positiva) y B668B (negativa). Para la preparación de este medio se utilizó ácido D-glucónico-Lactona, por lo que al preparar el medio este se tornaba ácido (amarillo), entonces se tuvo que ajustar el pH final a 7.2 con NaOH 1N y se lo estabilizó con hepes (5.2 gr/ lt).

Galactosa. Se probaron las cepas B747D (positiva) y B778C (negativa).

3.4. EVALUACION DEL SISTEMA MINIATURIZADO PARA LA IDENTIFICACION BIOQUIMICA TOMANDO COMO REFERENCIA A LA METODOLOGIA CLASICA

Para la validación de esta nueva metodología, se probaron las cepas E22, B668B, ILI y 158. Es decir, se hizo la bioquímica completa para cada una de estas cepas varias veces, tanto con la metodología clásica como con la miniaturizada como lo indica la tabla 6, obteniéndose los mismos resultados tanto con la técnica clásica como con la miniaturizada. La cepa E22 correspondió a una bacteria de tipo *Vibrio vulnificus* (100%), la B668b a *Pseudomonas* sp. (100%), la ILI a *Vibrio fluvialis* (90%) y la 158 a *Vibrio fluvialis* (94%).

3.5. APLICACION DEL SISTEMA MINIATURIZADO PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DESCONOCIDAS.

Utilizando la microplaca como fue descrito previamente se probaron un total de 36 aislados: Las cepas de la 1 a la 9, fueron aisladas de un laboratorio de larvas ubicado en Playas (las muestras provenían de macerados de larvas de dos tanques de cultivo), de la 10 a la 13, fueron aisladas de un laboratorio de larvas de camarón en Cuba, de la 14 a la 34, fueron aisladas de un laboratorio ubicado en Ayangue (las muestras de la 14 a la 19 provenían de macerados de larvas de dos tanques de cultivo, de la 20 a la 26 de tanques de algas, de la 27 a la 29 de la arena de la toma de agua, de la 30 a la 32 del filtro y de la 33 a la 34 de macerado de larvas con síndrome de bolitas) y las cepas 35 y 36 fueron aisladas de un laboratorio ubicado en San Pablo (las muestras provenían de macerado de larvas). La tabla 7 muestra los resultados de estas pruebas.

Tabla 5.- Comparación de los resultados obtenidos en la técnica clásica y la miniaturizada

Pruebas bioquímicas	EXPERIMENTO 1		EXPERIMENTO 2		EXPERIMENTO 3	
	Cepas positivas	Cepas negativas	C. positivas	C. negativas	C. positivas	C. negativas
NB, 0%ClNa	B668B	B743Hm	B668B	B743Hm	B668B	B743Hm
OF- oxidativo	B743Hm		B743Hm		B743Hm	
OF-fermentativo	B743Hm	B668B	B743Hm	B668B	B743Hm	B668B
Producción de indol	B754T	B668B	B754T	B668B	B754T	B668B
VP	B743Hm	B707HL1	B754T	B732Bt	B754T	B707HL1
Citrato de Simmons	B754T	B743Hm	B754T	B743Hm	B754T	B668B
Ornitina descarboxilasa	B707HL1	B754T	B732Bt	B754T	B732Bt	B754T
Arginina dihidrolasa	B754T	B732Bt	B754T	B732Bt	B754T	B732Bt
L-Arabinosa	B754T	B743Hm	B754T	B743Hm	V. fluvialis	B743Hm
Celobiosa	B754T	B743Hm	B754T	B743Hm	B754T	B668B
D-Manosa	B754T		B754T		B754T	
D-Manitol	B754T	B747D	B754T	B747D	B754T	B747D
Sucrosa	B754T	B747D	B754T	B747D	B754T	B747D
D-Glucuronato	B732Bt	B754T	B732Bt	B754T	B732Bt	B754T
D-Gluconato	B743Hm	B668B	B743Hm	B668B	B743Hm	B668B
Galactosa	B747D	B778C	B747D	B778C	B747D	B778C
TECNICA CLASICA						
NB, 0%ClNa	+	-	+	-	+	-
OF- oxidativo	+		+		+	
OF-fermentativo	+	-	+	-	+	-
Producción de indol	+	-	+	-	+	-
VP	-	-	+	+	+	-
Citrato de Simmons	+	+	+	+	+	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	+	-	+	-
Arginina dihidrolasa	+	-	+	-	+	-
L-Arabinosa	-	-	-	-	+	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	-
D-Manosa	+		+		+	
D-Manitol	+	-	+	-	+	-
Sucrosa	+	-	+	-	+	-
D-Glucuronato	+	-	+	-	+	-
D-Gluconato	+	-	+	-	+	-
Galactosa	+	-	+	-	+	-
T. MINIATURIZADA						
NB, 0%ClNa	+	-	+	-	+	-
OF- oxidativo	+		+		+	
OF-fermentativo	+	-	+	-	+	-
Producción de indol	+	-	+	-	+	-
VP	-	-	+	+	+	-
Citrato de Simmons	+	+	+	+	+	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	+	-	+	-
Arginina dihidrolasa	+	-	+	-	+	-
L-Arabinosa	-	-	-	-	+	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	-
D-Manosa	+		+		+	
D-Manitol	+	-	+	-	+	-
Sucrosa	+	-	+	-	+	-
D-Glucuronato	+	-	+	-	+	-
D-Gluconato	+	-	+	-	+	-
Galactosa	+	-	+	-	+	-

Los resultados se los expresa como un porcentaje de concordancia de las pruebas realizadas entre el aislado desconocido y la especie bacteriana a la que más se parece. Por ejemplo, en la cepa 1 un 94% de las pruebas realizadas coinciden con el patrón de una bacteria de tipo *V. vulnificus*. La variación en los porcentajes indica que un mayor o menor número de pruebas no coincidieron con los datos patrón de dichas bacterias. La utilización del programa de computadora mencionado en materiales y métodos solamente ayuda a encontrar a que especie bacteriana mayormente se asemeja el aislado desconocido, para después determinar manualmente dicho porcentaje de concordancia.

La interpretación de los resultados de todos los aislados probados son:

Cepa 1	<i>V. vulnificus</i> (94%)
Cepa 2	<i>V. parahaemolyticus</i> (90%)
Cepa 3	<i>V. vulnificus</i> (94%)
Cepa 4	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 5	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 6	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 7	<i>V. vulnificus</i> (100%)
Cepa 8	<i>V. vulnificus</i> (100%)
Cepa 9	<i>V. vulnificus</i> (100%)
Cepa 10	<i>V. vulnificus</i> (94%)
Cepa 11	<i>V. fischeri</i> (100%)
Cepa 12	<i>V. vulnificus</i> (94%)
Cepa 13	<i>V. fischeri</i> (100%)
Cepa 14	<i>V. alginolyticus</i> (88%)
Cepa 15	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 16	<i>V. harveyi</i> (82%)
Cepa 17	<i>V. harveyi</i> (82%)

Cepa 18	<i>V. anguillarum</i> (95%)
Cepa 19	<i>V. anguillarum</i> (95%)
Cepa 20	<i>V. anguillarum</i> (95%)
Cepa 21	<i>V. parahaemolyticus</i> (84%)
Cepa 22	<i>V. anguillarum</i> (95%)
Cepa 23	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 24	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 25	<i>V. fluvialis</i> (83%)
Cepa 26	<i>V. fluvialis</i> (83%)
Cepa 27	<i>V. harveyi</i> (94%)
Cepa 28	<i>V. fischeri</i> (95%)
Cepa 29	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 30	<i>V. pelagius</i> (95%)
Cepa 31	<i>V. fischeri</i> (95%)
Cepa 32	<i>V. campbellii</i> (94%)
Cepa 33	<i>V. campbellii</i> (94%)
Cepa 34	<i>V. splendidus</i> I (84%)
Cepa 35	<i>V. harveyi</i> (88%)
Cepa 36	<i>V. anguillarum</i> (95%)

Tabla 7.- Resultados de las pruebas bioquímicas de cepas desconocidas

	TCBS	Agar marino	Forma	Motilidad	Gram	Oxidasa	Catalasa
cepa1	colonia amarilla plana		Bacilos	+	-	+	+
cepa2	colonia amarilla plana		Bacilos	+	-	+	+
cepa3	colonia amarilla plana		Bacilos	+	-	+	+
cepa4	colonia amarilla cóncava		Bacilos	+	-	+	+
cepa5	colonia amarilla cóncava		Bacilos	+	-	+	+
cepa6	colonia amarilla cóncava		Bacilos	+	-	+	+
cepa7	colonia verde		Bacilos	+	-	+	+
cepa8	colonia verde		Bacilos	+	-	+	+
cepa9	colonia verde		Bacilos	+	-	+	+
cepa10	colonia verde	c. cremosa mediana (TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa11	colonia verde mediana	c. transparente (TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa12	colonia verde mediana	N.C.	Bacilos	+	-	+	+
cepa13	colonia verde pequeña	c. pequeña transparente (TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa14	colonia amarilla mediana	colonia naranja mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa15	colonia amarilla mediana	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa16	colonia amarilla mediana	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa17	colonia amarilla mediana	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa18	c. amarilla-verde mediana	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa19	colonia verde pequeña	colonia amarilla mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa20	colonia amarilla grande	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa21	colonia verde mediana	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa22	colonia amarilla grande	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa23	colonia verde mediana	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa24	colonia grande amarilla	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa25	colonia mediana amarilla	colonia blanca mediana	Bacilos	+	-	+	+
cepa26	colonia grande amarilla	spreader blanco traslúcido(TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa27	colonia verde mediana		Bacilos	+	-	+	+
cepa28	colonia amarilla grande		Bacilos	+	-	+	+
cepa29	c. amarilla-verde brillante		Bacilos	+	-	+	+
cepa30	colonia amarilla pequeña		Bacilos	+	-	+	+
cepa31	c. verde,bordes traslúcidos		Bacilos	+	-	+	+
cepa32	N.C.	c. cremosa mediana(TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa33	colonia amarilla	c. cremosa mediana (TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa34	colonia amarilla	c. planas traslúcidas (TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa35	colonia amarilla pequeña	c.blanca mediana rizoidea(TSA)	Bacilos	+	-	+	+
cepa36	colonia amarilla pequeña	spreader, traslúcidas(TSA)	Bacilos	+	-	+	+

CONCLUSIONES

La bacteriología se sitúa en los campos prioritarios de la investigación para la acuicultura de camarones, esto en términos de sustentabilidad económica y ecológica. En efecto, las bacteriosis ocasionan mortalidad con carácter de epidemia y/o endemia en los laboratorios y en las camaroneras. El impacto económico real de estas enfermedades es largamente subestimado ya que la etiología de las enfermedades de camarón es solo relativamente determinada por falta de herramientas y de técnicas de diagnóstico adaptadas.

Desde el punto de vista ecológico, existe un problema mayor que corresponde a los desechos y residuos de antibióticos que son utilizados masivamente sin considerar los riesgos de resistencia de cepas patógenas de camarones o del hombre.

La estrategia únicamente reconocida para prevenir y controlar las bacteriosis se basa en primer lugar en la caracterización y la identificación de cepas asociadas al camarón, tratando de determinar su naturaleza netamente patógena o probiótica, esto en base a infecciones experimentales y a análisis epidemiológicos. En segundo lugar la prevención de bacteriosis depende por una parte de la disponibilidad de herramientas de diagnóstico de cepas patógenas netamente basadas en la utilización de sondas moleculares y por otra parte de la utilización de cepas probióticas capaces de interferir con el desarrollo de cepas patógenas.

La identificación bacteriana parece por lo tanto como el elemento clave de esta estrategia. Por referencia con la bacteriología médica, la identificación bacteriana necesita integrar caracteres morfológicos, bioquímicos, antigénicos y genéticos, lo que significa la puesta en marcha de una gran diversidad de técnicas. Sin embargo, conviene analizar los campos de aplicación de cada uno de los tipos de caracteres. La identificación bioquímica

correspondiente principalmente a la determinación taxonómica de una bacteria a la escala específica, los otros criterios son más utilizados a los niveles subespecíficos y para el diagnóstico rápido de una cepa dada con la ayuda de sondas nucleicas muy específicas.

Desde el punto de vista de trabajos básicos de bacteriología netamente en la fase descriptiva de bacterias asociadas al camarón, la identificación bioquímica se presenta como primordial y prioritaria.

Los conocimientos sobre las bacterias del camarón son en la actualidad extremadamente limitadas esencialmente en razón de lo inadecuado de las técnicas clásicas de identificaciones bioquímicas que son difíciles de poner en marcha, lo que limita fuertemente el número de análisis que pueden ser realizados y que vuelven casi imposible los estudios epidemiológicos que necesitan identificar numerosos aislados.

En bacteriología y epidemiología humana, este problema técnico fue superado por el desarrollo de sistemas miniaturizados mucho más simples y rápidos de manipular que el conjunto de tubos con medios de cultivo, los cuales permiten realizar las pruebas necesarias y suficientes para un grupo de bacterias dadas, por ejemplo las Enterobacterias humanas.

En la óptica de abrir la vía a este tipo de herramientas para la bacteriología de camarones, la elección se orientó inicialmente en el grupo de los *Vibrios* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. y *Photobacterium* spp. en razón de su importancia mayor en camaronicultura.

Un análisis exhaustivo permitió establecer la lista de especies que deben ser consideradas y seguidamente los criterios bioquímicos necesarios y suficientes para reconocer y distinguir de la mejor manera todas estas especies. Simultáneamente los

protocolos de cada prueba fueron analizados desde el punto de vista de su factibilidad de ser realizadas en condiciones miniaturizadas. Así se escogieron 21 criterios morfológicos y bioquímicos, siendo posible miniaturizar 16 de ellos.

El sistema miniaturizado que fue escogido corresponde a microplacas disponibles bajo la forma de placas de 96 pozos (12 columnas de 8 pozos) y también columnas de 8 o 16 pozos respectivamente. Estos dispositivos están disponibles en el mercado y son relativamente baratos. Teniendo en cuenta que cada identificación necesita de 16 pozos, una microplaca de 96 pozos permite por lo tanto realizar 6 identificaciones.

El desarrollo del sistema miniaturizado, teniendo como objetivo la obtención de un "kit" de identificación fue relativamente simple. Para cada prueba se escogieron bacterias que debían dar una respuesta positiva y negativa respectivamente y estas fueron utilizadas en paralelo según la metodología clásica y el método miniaturizado. Sucesivamente, el protocolo operativo fue establecido y optimizado para cada prueba en el sistema miniaturizado.

Se probaron bacterias según la técnica clásica en series de tubos de ensayo y según la técnica miniaturizada en microplacas, los resultados estuvieron en perfecta concordancia.

El sistema miniaturizado fue posteriormente utilizado en grandes series de identificación de bacterias de diversos orígenes, poniendo en evidencia las ventajas en términos de rapidez y simplicidad.

Dentro de esta concepción actual, donde es necesario poner los diferentes medios en los pozos de la placa con la ayuda de una micropipeta simple, se mostró que alrededor de 30 aislados pueden ser analizados cada día por un técnico. Este número podrá ser

aumentado utilizando algunas herramientas como multipipetas que permiten distribuir simultáneamente 8 medios diferentes en las microplacas y de micropipetas de repetición que permiten distribuir muy rápidamente un volumen similar de suspensión bacteriana en una serie de pozos de cultivo.

Dentro de una perspectiva de utilización a gran escala de este sistema miniaturizado, será posible utilizar una bomba peristáltica con 16 salidas permitiendo distribuir simultáneamente los 16 medios, esto tiene un gran ritmo. Entonces convendrá reflexionar en la industrialización de este producto considerando como socio a un grupo especializado en la tecnología de micropruebas pudiendo los medios ser liofilizados o desecados en las microplacas, esta segunda posibilidad corresponde a una tecnología más simple de poner en marcha que la liofilización.

A corto plazo, la distribución comercial de este primer sistema de identificación específicamente aplicable a bacterias asociadas al camarón, podría consistir en la venta de un lote de 50 unidades de 16 pozos acompañado de 16 tubos conteniendo cada uno 5 ml de cada uno de los medios, permitiendo este "kit" realizar 50 identificaciones bioquímicas.

Teniendo en cuenta la simplicidad de utilización es de hecho proyectable de difundir este sistema en los laboratorios y camaroneras a fin de que los acuicultores puedan determinar la flora bacteriana del medio ambiente específico y también detectar situaciones anormales, por ejemplo, la presencia masiva de ciertos vibrios considerados como patógenos para el camarón.

La identificación puede ser hecha con la ayuda de un programa simple que deberá ser transmitido a todas las empresas a fin de que puedan manejar su información y de facilitar su trabajo.

Este sistema puesto a punto en CENAIM, abre la vía a la miniaturización de técnicas bacteriológicas en camaronicultura, por ejemplo para los antibiogramas. El éxito de estas nuevas herramientas dependerá grandemente de la comunicación entre los científicos y los productores quienes deberán ser convencidos de las ventajas que tendrán al modernizar sus unidades de microbiología donde deberán también poder utilizar las pruebas de diagnóstico basadas en sondas moleculares. Para las empresas pequeñas todas estas nuevas metodologías de diagnóstico podrán ser accesibles a nivel del centro de diagnóstico.

RECOMENDACIONES

Tratar de poner a disposición de los productores este sistema miniaturizado bajo la forma de "Kits" relativamente simples, por ejemplo los lotes de 50 unidades y 16 medios de cultivo.

Organizar la transferencia tecnológica al centro de diagnóstico y a los bacteriólogos de las empresas por medio de entrenamientos cortos organizados por la CAMARA NACIONAL DE ACUICULTURA y el CSA (Centro de Servicios a la Acuicultura).

Establecer contactos con industriales para elaborar sistemas listos a usar con los medios ya presentes en los pozos, las tecnologías de secado podrán ser más fáciles de aplicar.

Emprender la puesta a punto de sistemas similares para estos grupos de bacterias importantes para el cultivo del camarón y para otros campos de aplicación, por ejemplo los antibiogramas.

BIBLIOGRAFIA

- AUSTIN, B. 1991. Identification. En Austin, B. (ed.) 1991. Methods in aquatic bacteriology, 95-111.
- AUSTIN, B. 1995. *Vibrionaceae* representative as pathogens of penaeid shrimps. En Calderón, J. V., Sorgeloos, P. (ed.). Memorias del segundo congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 189-192.
- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL OF THE DIVISION OF MICROBIOLOGY CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION U.S. F.D.A. 1984. Sixth edition .
- BARKATE, J. A. 1972. Preliminary studies of some shrimp diseases. *Proc. Wld Mariculture. Soc.*, **3**, 337-344., citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- BATICADOS, M. C. L. 1988. Diseases of prawns in the Philippines. *SEAFDEC Asian Aquacult.*, **10**, (1), 1-8, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- BRINKLE, A.W., ROMMEL, F.A. AND HUBER, T.W. 1976. The isolation of *vibrio parahaemolyticus* and related vibrios from moribund aquarium lobsters. *Can. J. Microbiol.*, **22**, 315-317, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- BRISOU, J., TYSSET, C., RAULTIN DE LA ROY & CURCIER, R. 1965. Marine bacteria especially Micrococcaceae. *J. gen. Microbiol.*, **41**, 23, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- BROCK, J. A. & LIGHTNER, D.V. 1990. Diseases caused by microorganisms. En: Kinne,O. (ed.) 1990. Diseases of marine animals. Vol. III. 296-326.
- CHRISTOPHER, F.M., VANDERZANT, C., PARKER, J.D & CONTE, F.S. 1978. Microbial flora of pond-reared shrimp (*Penaeus stylirostris*, *Penaeus vannamei*, and *Penaeus setiferus*). *J. Fd. Prot.*, **41**, 20-23, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

- COLWELL, R.R., HUQ, A., CHOWDHURY M.A.R., BRAYTON, P.R. & XU, B. 1995. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. *Can. J. Microbiol.* 41: 946-950 (1995).
- DIFCO MANUAL. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth edition. DIFCO Laboratories. Detroit Michigan USA.
- FINEGOLD, S. N., BARON, E. 1989. Diagnóstico microbiológico. Séptima edición. 426 p.
- FISHER, W.S. 1977a. Microbial epibionts of Dungeness crabs. In C. J. Sindermann (Ed.), *Disease, Diagnosis and control in North American Marine Acuaquulture*. Elsevier, New York. pp. 142-146., citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- FISHER, W.S. 1977b. Microbial epibionts of lobsters. In C. J. Sindermann (Ed.), *Disease, Diagnosis and control in North American Marine Acuaquulture*. Elsevier, New York. pp. 163-167, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- FISHER, W.S. 1977c. Epibiotic microbial infestations of cultured crustaceans. *Proc. Wld Maricult. Soc.*, 8, 673-684, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- FISHER, W. S. 1988a. Microbial epibionts of Dungeness crabs. In C. J. Sindermann (Ed.), *Disease, Diagnosis and control in North American Marine Acuaquulture*. 2nd ed. Elsevier, New York. pp. 222-225, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- FISHER, W. S. 1988c. Microbial epibionts of lobsters. In C. J. Sindermann (Ed.), *Disease, Diagnosis and control in North American Marine Acuaquulture*. 2nd ed. Elsevier, New York. pp.243-246, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- FISHER, W. S. and Wickhan, D. E. 1977. Egg mortalities in wild populations of the Dungeness crab in central and northern California. *Fish. Bull. U. S.*, 75, 235-237, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

- FRERICHS, G. N. & MILLAR, S. D. 1993. Manual for the isolation & identification of fish bacterial pathogens. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, 12-52.
- GUOXING, Z. 1986. Identification and pathogenicity of *Vibrio cholera* (non-01) isolated from diseased penaeid shrimp. (In Chinese). *J. Fish. China*, 10, 195-203, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V. 1990.
- HOLT, J.G. & KRIEG, N.R. (ed.). 1984. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol.I. p. 516-548. Williams & Wilkins.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H., STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. (ed.). 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology. Ninth edition. Williams & Wilkins.
- ISHIMARU, K., AKAGAWA-MATSUSHITA, M. & MUROGA, K. 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of Kuruma Prawns (*Penaeus japonicus*). En International Journal of Systematic Bacteriology, Jan. 1995, p. 134-138.
- KAMPFER, P., BETTE, W., & DOTT, W. 1987. Phenotypic differentiation of members of the family Vibrionaceae using miniaturized biochemical tests. IFREMER. Zbl. Bakt. Hyg. A 266, 425-437.
- KRANTZ, G.E., COLWELL, R.R. & LOVELACE, E. 1969. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab, *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. *Science*, N.Y., 164, 1286-1287, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V. 1990.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. 1993. Principles of Biochemistry. Second edition.
- LEWIS, D.H. 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio* sp. *Proc. Wld. Maricult. Soc.*, 4, 333-338, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V. 1990.
- LIGHTNER, D.V. 1975. Some potentially serious disease problems in the culture of penaid shrimp in North America. In Proceedings of the third U. S. -Japan Meeting on Aquaculture, 27, 149-155, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V. 1990.

- LIGHTNER, D. V. 1977. Virus disease of shrimps. In C. J. Sindermann (Ed.), *Disease, Diagnosis and control in North American Marine Acuaqulture*. Elsevier, New York. pp. 10-77. Citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- LIGHTNER, D.V. 1983. Diseases of cultured penaid shrimp. In J. R. Moore (Ed.-in-Chief), CRC Handbook of Mariculture, Vol. I.J.P. Mc.Vey (Ed.), Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 289-320, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990
- LIGHTNER , D.V. 1985 . A review of the diseases of cultured penaid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. In Y. Taki, J. H. Primavera and J. A. Llobrera (Eds), *Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/ shrimps*. Aquaculture Dept., SEAFDEC, Iliolo, Philippines. pp. 79-103, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- LIGHTNER, D.V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. In C. J. Sindermann and D.V. Lightner (Eds), *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*, 2nd ed. Elsevier, New York. pp. 8-127, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- LIGHTNER, D.V. & LEWIS, D.H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.*, **37** (5-6), 25-28, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.
- LIGHTNER, D.V. 1993. Shrimp pathology: Major diseases of concerned to the farming industry in the Americas. En Calderón, J. V., Sandoval, V. C.(ed.). *Memorias del primer congreso Ecuatoriano de acuicultura*, 177-195
- LIGHTNER, D.V. 1995. (ed.). *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. Vibriosis-Culture and Identification*, 1-27
- MANUAL OF BBL® PRODUCTS AND LABORATORY PROCEDURE. 1988. Sixth edition.
- MIALHE, E., BOULO, V., BACHERE, E., HERVIO, D., COUSIN, K., NOEL, T., OHRESSER, M., LE DEUFF, R.M. & GENDREAU, S. 1992. Development of new methodologies for diagnostic of infectious diseases in mollusc and shrimp

aquaculture. *Aquaculture*. 107: 1-10.

OVERSREET, R.M. 1978. *Marine Maladies? Worms, Germs, and other symbionts from the northern gulf of Mexico*. MASGP-78-021, Mississippi-Alabama sea grant consortium, Ocean Springs, Mississippi, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P. & KLEIN, D.A. 1993. *Microbiology*. Second edition. 672-697,55.

RODINA, A.G. 1972. *Methods in aquatic microbiology*. 54-63 , 85-131.

ROSEMARK, R. & FISHER, W.S. 1988. *Vibriosis of lobsters*. In C. J. Sindermann and D. V. Lightner (Eds). *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*, 2nd ed. Elsevier, New York. pp. 240-242, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

SANDERS, E. & FRYER, J.L. *Bacteria of fish*. En: Austin, B. (ed.). 1991. *Methods in aquatic bacteriology*. 115-123.

SCHNEIDER, J. & RHEINHEIMER, G. *Isolation Methods*. En: Austin, B. (ed.) 1991. *Methods in aquatic bacteriology*. 73-92.

SINGLETON, P. & SAINSBURY, D. 1987. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. Second edition.

SPARKS, A.K. & MORADO, J.F. 1985. *A preliminary report on the diseases of Alaska king crabs*. In *proceedings of the international king crab symposium*. Alaska sea grant college program, University of Alaska. Fairbanks. pp. 333-339, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

TUBIASH, H.S. & KRANTZ, G.E. 1970. *Experimental bacterial infection of the blue crab*. American society for microbiology, annual meeting, Boston, Mass., 26 April-1 May. p. 27, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

VANDERZANT, C., MROZ, E. & NICKELSON, R. 1970a. *Microbial flora of Gulf of Mexico and pond shrimp*. *J. Milk Fd Technol.*, 33, 346-350, citado por Brock, J.

A. and Lightner, D. V.1990.

VANDERZANT, C., NICKELSON, R. & PARKER, J.C. 1970b. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from gulf coast shrimp. *J. Milk Fd Technol.*, **33**, 161-162, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

VANDERZANT, C., NICKELSON, R. & JUDKINS, P.W. 1971. Microbial flora of pond-reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Appl. Microbiol.*, **21**, 916-921, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

YASUDA, K. & KITAO, T. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, **19**, 229-234, citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V.1990.

ANEXOS

PRUEBAS BIOQUIMICAS USADAS EN LA TECNICA MINIATURIZADA

1. Reacción de Gram
2. Forma
3. Motilidad
4. Oxidasa
5. Catalasa
6. Crecimiento 0%NaCl
7. Tipo de metabolismo (Oxidativo)
8. Tipo de metabolismo (Fermentativo)
9. Producción de indol
10. Reacción de Voges-Proskauer
11. Citrato, Simmons
12. Ornitina descarboxilasa
13. Arginina dihidrolasa
14. L-Arabinosa
15. Celobiosa
16. D-Manosa
17. D-Manitol
18. Sucrosa
19. D-Glucuronato
20. D-Gluconato
21. Galactosa

MICROPLACA

