



**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua**  
**UNAN – LEÓN**

**Facultad de Ciencias Puras**

**Departamento de Biología**



**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO VIBRIO EN AGUAS DEL  
ESTERO DE LAS PEÑITAS, LEÓN”.**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

- ◆ **BR. GUADALUPE ALVAREZ ESTRADA**
- ◆ **BR. SIMÓN ALBERTO PEREIRA SOMARRIBA**

**TUTOR:**

- ◆ **MSC. OCTAVIO GUEVARA VILLAVICENCIO**

**ASESOR:**

- ◆ **LIC. AURA LYLI OROZCO SOLORZANO**

*León, Noviembre de 2003*



**INDICE.**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINAS</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>I -) INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>II -) OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>III -) MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1 -) Microbiología de Aguas</b> .....	<b>6</b>
<b>3.2 -) Familia Enterobacteriaceae</b> .....	<b>8</b>
<b>3.2.1 -) Genero: Edwardsiella</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3 -) Familia Vibrionaceae</b> .....	<b>9</b>
<b>3.4 -) Condiciones Físico – Químicas del Metabolismo Bacteriano</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4.1 -) Temperatura</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4.2 -) PH</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4.3 -) Actividad del Agua</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4.4 -) Potencial de Oxido Reducción</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4.5 -) Requerimientos Nutritivos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4.5.1 -) Carbono</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4.5.2 -) Nitrógeno</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4.5.3 -) Oxigeno</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 -) Estructura Celular</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5.1 -) Pared Celular</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5.2 -) Membrana Celular</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5.3 -) Bioquímica Microbiana</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5.3.1 -) Aminoácidos</b> .....	<b>24</b>



3.5.3.2 -) Aminoácidos con grupo R no Polares.....	25
3.5.3.3 -) Aminoácidos con grupo R Polares sin carga .....	26
3.5.3.4 -) Aminoácidos con grupo R cargados positivamente .....	28
3.5.3.5 -) Aminoácidos con grupo R cargados negativamente .....	30
3.5.4 -) Metabolismo de los Aminoácidos.....	30
3.5.4.1 -) Proteínas .....	31
3.6 -) Pruebas Bioquímicas para caracterización de <i>Vibrios</i> .....	32
3.6.1 -) Prueba de Voges – Proskauer.....	32
3.6.2 -) Prueba del Rojo de Metilo .....	32
3.6.3 -) Prueba de Indol.....	34
3.6.4 -) Tinción de Gram.....	35
3.6.5 -) Prueba de Oxidasa.....	36
3.6.6 -) Aislamiento y Depuración del Crecimiento Bacteriano .....	37
3.6.7 -) Caldo VPRM.....	38
3.6.8 -) O/ F, Medio Fluido .....	38
3.6.9 -) Agar Mueller – Hinton.....	39
3.6.10 -) Descarboxilasa Lysina.....	39
3.6.11 -) Arginina.....	40
3.7 -) Aislamiento y Depuración del Crecimiento Bacteriano .....	40
3.7.1 -) Medios de Cultivo .....	40
3.8 -) enriquecimiento .....	42
3.8.1 -) Agar TCBS .....	42
IV -) METODOLOGÍA .....	43
A) Preparación de Medios de Cultivo .....	44
4.1.1 -) Agar T: C. B. S.....	44
4.1.2 -) Agar T. S. A.....	44



<b>4.1.3 -) Tinción de Gram.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.4 -) Prueba de Catalasa.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.5 -) Prueba de Oxidasa.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.6 -) Prueba de Motilidad.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.7 -) Prueba de IMVIC .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.8 -) Pruebas Adicionales .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.9 -) Antibiograma .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.10 -) Aislamiento y Caracterización Bacterial.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.11 -) Pruebas bioquímicas de Bacterias Aisladas.....</b>	<b>50</b>
<b>V -) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>VI -) CONCLUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
<b>VII -) RECOMENDACIÓN .....</b>	<b>66</b>
<b>VIII -) BIBLIOGRFÍA .....</b>	<b>67</b>
<b>IX -) ANEXOS .....</b>	<b>69</b>



## DEDICATORIA.

*A Dios que es el merecedor de todo lo bueno, por permitirme vivir hasta el día de hoy y poder alcanzar este logro en mi vida.*

*En especial a mi padre el licenciado Atilano Álvarez Ortiz por que me brindó el amor de padre, deposito en mi confianza y lucho trabajando para ayudarme a sostener mis estudios y que nada me faltara para poder realizarme como profesional.*

*A mi madre María Elena Estrada por guiarme espiritualmente en lo moral, por su consejo y haberme dado su calor materna.*

*A mis hermanos que estuvieron conmigo apoyándome, aconsejándome y comportándose como amigos.*

*A todas aquellas personas que me ayudaron de una u otra manera en todos los ámbitos.*

*Guadalupe Álvarez Estrada.*



---

## DEDICATORIA.

*Le doy gracias a Dios Todopoderoso por haberme dado la oportunidad de haber culminado mi carrera y por estar siempre en todos los momentos de mi vida.*

*A mi abuela María Cristina Briones de Somarriba (q. e. p .d) por haberme acogido y amado desde que nací y por darme siempre buenos consejos.*

*A mis padres Dr. Oscar Danilo Pereira López y Gloria María Somarriba de Pereira por su amor hacia mi persona, por sus esfuerzos para que nunca me faltara nada hasta hoy en día, por ser los guiadores de mi vida personal, por su apoyo y confianza en mi vida y así lograr lo que hoy culmino como una de las metas de mi vida y ser un hombre de bien y servirle a la patria.*

*A mi esposa Lic. María José Rocha González y a mi hijo Simón Alexander por estar siempre presente en mi vida, ser la fuerza necesaria que un ser necesita para salir siempre adelante.*

*A mis hermanos Oscar y Gloria. A mis tíos Somarriba Briones e hijos. A mi suegra Lic. Ángela González G. A mis amigos por sus buenos consejos, animo y oraciones.*



*A mis maestros desde mis primeras letras hasta la Universidad por ser los que han cultivado y compartido sus enseñanzas.*

*Gracias Señor Todopoderoso y Virgen Santísima por darme esta oportunidad muy importante en mi vida para seguir haciendo y caminando para tu obra y gloria.*

*Simón Alberto Pereira Somarriba.*



## **AGRADECIMIENTO.**

*Agradecemos a todas aquellas personas que hicieron posible la culminación de esta Monografía, en especial a nuestro Tutor Msc. Octavio Guevara por su empeño y por haber depositado su confianza en nosotros.*

*A la responsable del Laboratorio Lic. Aura Lyli Orozco Solorzano por facilitarnos los medios de trabajo, conocimientos aportados y la ayuda que nos brindaron.*

*Al igual agradecemos a la siguiente persona:*

❖ *Lic. Vanessa Muñoz.*

*Y a todas aquellas personas que nos ayudaron de una u otra forma.*





## RESUMEN.

Estudio realizado en el Sector de la Costa y estero de las Peñitas ubicado al sur del Balneario de Poneloya (Sutiava).

El grupo *Vibrio sp* está colocado junto a las Bacterias entéricas de ahí la importancia de su estudio: Tienen afinidad por la sal, es decir, son halofílicas ya que requieren de NaCl y está constituidos de bacilos Gram negativos, son sensibles al agente Vibriostático 0/129. El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la presencia del género *vibrio* en aguas marinas en este estero, mediante la aplicación de técnicas microbiológicas y así como también identificar correctamente la especie mediante la aplicación de Pruebas Bioquímicas.

El trabajo se efectuó de Enero a Septiembre del 2003. Este es de mucha importancia debido a que la camaronicultura en Nicaragua, se ha incrementado notoriamente y de ahí el interés por el estudio del género *vibrio*, ya que cuando este ataca se producen cuantiosas pérdidas incluso los puede llevar al fracaso y de ahí el interés por poder identificarlas por especies y no sólo como colonias verdes y amarillas.

En conclusión en las muestras de aguas que se tomaron cerca del sedimento se encontraron mayor prevalencia de *vibrios*, no ocurriendo así en las muestras tomadas en la superficie por lo que se logró llegar a identificar el *Vibrio pelagius*, *Edwardsiella sp* y *Vibrio alginolyticus*.



De acuerdo a los resultados anteriores, se necesitó hacer un estudio más frecuente con muestreo y un aislamiento seriado para lograr determinar más especies de *vibrios* presentes en aguas marinas importantes para la camaronicultura.



## I.- INTRODUCCIÓN.

Las bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, pues se hallan en casi todas partes. Su número y especie varían de un lugar a otro, según las condiciones ambientales.

La mayoría de las aguas contienen bacterias en abundancia. Su número varía considerablemente según el origen de aquellas que pueden ser profundas o superficiales, de manantial, río, lago, charco, pantano y mar. Existen muchos microorganismos formadores de planctón marino donde una de las bacterias del género *vibrio* se encuentran en todas las épocas del año.

En el agua de mar existen diversas especies bacterianas como las pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, algunas de las cuales son responsables de causar enfermedades en los organismos marinos tales como: peces y camarones e incluso al hombre.

Los individuos pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* son de gran importancia económica y médica debido a los efectos nocivos que pueden causar los humanos y organismos acuáticos.

Es por eso que las investigaciones sobre la biología de estos ha ido incrementándose de manera singular en los diferentes medios acuáticos donde estos puedan encontrarse.

En Nicaragua el estudio de estos ha sido poco debido a los escasos recursos con los que cuenta el país; desde que la camaronicultura apareció se



han obtenido pérdidas considerables con esta afectación, lo que ha obligado a los camaronicultores a buscar medidas de control sanitario para contrarrestar dicha afectación.

Es por eso que se ha seleccionado este tema teniendo como punto de referencia el Estero de Las Peñitas ubicado a 19 kilómetros de la parte Oeste de la ciudad de León.

Nuestro estudio está dirigido a la detección de las especies *Vibrio pelagius*, *Edwardsiella sp* y *Vibrio alginolyticus*.



## II.- OBJETIVO GENERAL.

- \* Determinar la presencia de la bacteria del género *Vibrio* en aguas marinas del sector Estero de Las Peñitas, León mediante la aplicación de Técnicas Microbiológicas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- \* Aislamiento y caracterización de las bacterias del género *Vibrio* en muestras de agua del Estero de las Peñitas.
- \* Determinar rangos de tolerancia de salinidad en bacterias aisladas.
- \* Identificar la especie *Vibrio* aplicando pruebas bioquímicas.



### III.- MARCO TEÓRICO.

#### 3.1 -) Microbiologías de Aguas.

Las bacterias planctónicas son principalmente gram negativos (80% a 95%) y a menudo son móviles, pleomorficas y pigmentadas. Muchas bacterias, particularmente en océanos con bajo contenido de nutrientes y lagos oligotróficos, son muy pequeñas, con frecuencia menos de 0.5  $\mu\text{m}$  en su máxima dimensión. Por lo general son muy eficientes para remover la materia orgánica, tienen muy bajos requerimientos de nutrientes y oxígeno, baja demanda de mantenimientos y un tiempo de duplicación muy prolongado.

La mayoría de las bacterias no están libres en el agua sino que están adheridas a partículas, especialmente materia orgánica. Su biomasa es pequeña en comparación con los productos primarios, pero su actividad es más importante en el reciclamiento de los nutrientes, sobre todo cuando la zona fótica está aislada del agua subyacente por una termoclina. Gran parte de la mineralización del fósforo se lleva a cabo en el epilimnio, a menudo muy rápidamente, con tiempo de recambio de sólo unos minutos en condiciones óptimas.

Una vez que la materia se ha hundido por debajo de la termoclina, debe esperarse a que se rompa la estratificación antes de que se pueda usar de nuevo por la mayor parte del fitoplanctón, de modo que la cantidad de materia reciclada en la zona fótica es de gran importancia para la productividad de las algas.



El número de bacterias varía mucho, principalmente en relación con la cantidad de materia orgánica, la cual puede ser aloctona o autóctona. Por lo general, el recuento de organismos viables varía de 100 por ml<sup>-1</sup> a varios miles por ml<sup>-1</sup> los recuentos más importantes se pueden encontrar justo por debajo de la termoclina si el agua está estratificada, o en gradientes de potencial redox cerca del sedimento y en hipolimnios anoxicos. Estas bacterias anaerobias producen metano y compuesto de azufre reducido, los quimiolitotrofos pueden ser también importante en hipolimnios anoxicos.

Las cianobacterias y las bacterias fotosintéticas se localizan exactamente donde la temperatura, luz, salinidad y concentración de ácido sulfhídrico están dentro de sus límites de tolerancia, en forma alternativa pueden permanecer a cierta profundidad a medida que la quimioclina se desplaza hacia arriba y hacia abajo durante el día, pero cambian su metabolismo; en consecuencia, las cianobacterias pueden cambiar su actividad y fotosintetizar en condiciones anoxicas en presencia de sulfuro.

Muchas de estas bacterias y cianobacterias, que tienen que mantenerse en un sitio preciso, contienen vacuolas de gas que pueden producir pequeños cambios de flotación y controlar con precisión la profundidad en la que vive el organismo. Estos mecanismos son los más importantes cuando no hay turbulencias.

En los ríos, los recuentos más altos, por lo general, se observan en las profundidades donde los niveles de materia orgánica son a menudo más altos, y esto también se refleja en el alto nivel de nitrato y en el bajo nivel de



oxígeno, por el contrario los manantiales y otras aguas limpias tienen pocas bacterias en el planctón.

### **3.2 -) Familia: *Enterobacteriaceae*.**

Son bacilos rectos usualmente tienen un diámetro de 0.3 a 1.8  $\mu\text{m}$  son Gram negativos, son motiles por medio de flagelos peritricos anaeróbicos facultativos, la mayoría de las especies crecen bien a 37<sup>0</sup> C, sin embargo, algunas especies crecen mejor 25<sup>0</sup> – 30<sup>0</sup> C. A partir de glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácidos y en muchas especies gas, son oxidasa negativa y catalasa positiva tiene una distribución mundial, pueden encontrarse en el suelo, agua, frutas, vegetales, plantas con flores y árboles, y en animales se encuentran en: gusanos, insectos y humanos.

Un número de especies causan enfermedades diarreicas, incluyendo la fiebre tifoidea y disentería bacilar, muchas especies que normalmente no están asociadas con enfermedades diarreicas son a menudo referidas como patógenas oportunistas. La mayoría de estas especies causan enfermedades diarreicas que pueden producir una gran variedad de infecciones extraintestinales incluyendo bacteremia, meningitis en el tracto urinario y espiratorio.

#### **3.2.1 -) Género: *Edwardsiella*.**

Son Gram negativos pequeños, motiles debido a que presentan flagelo peritrico. Son anaeróbicos facultativos y químico organotróficos, con un tipo de metabolismo fermentativo y aerobio, temperatura óptima de crecimiento 37<sup>0</sup> C De glucosa y algunos otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácidos y a menudo gas. Oxidasa negativa, catalasa negativa,





Voges Proskauer y Nitrato de Simon son negativo. la Lysina descarboxilasa y usualmente la ornitina descarboxilasa son positivos, se encuentran frecuentemente en el intestino de los animales de sangre fría y en ambiente particularmente de agua fresca, también pueden encontrarse en animales de sangre caliente y humanos SON RARAMENTE PATÓGENOS OPORTUNISTAS PARA LOS HUMANOS, *Edwardsiella* bioquímicamente es similar *E. Coli*, *Shigella* y *Salmonela* pero es fácilmente diferenciado.

Las *enterobacteriaceae* son responsables del 50% de infecciones nosocomiales.

### **3.3 -) Familia: *Vibrionaceae*.**

Los Vibrios tienen amplia distribución en la naturaleza, son comunes en ambientes marinos, algunas especies se encuentran sobre la superficie y fondo y en contenido intestinal de animales marinos; también es posible encontrarlos en agua dulce donde sobreviven algunas horas o algunas semanas, si estas se encuentran contaminadas con materia orgánica y si tienen las condiciones adecuadas de salinidad.

La familia *Vibrionaceae* esta constituida de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, presentan ambos tipos de metabolismos fermentativo y aerobio, glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con producción de ácido pero no de gas, son sensibles al agente vibriostático 0/129, Oxidasa positiva y el ión sodio estimula su crecimiento. También existen especies que son causantes de enfermedades en peces y moluscos (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio tubiashii*, *Vibrio salmonicida* y *Vibrio pelagius* entre otros). Las especies patógenas humanas son alrededor de unas doce



especies, siendo las más importantes (*Vibrio cholerae*, el agente causante del cólera y *Vibrio parahaemolyticus*, causando intoxicaciones alimentarias por peces y moluscos contaminados.

De los problemas estudiados los principales han sido los de tipo bacteriano, infecciones por *Vibrio* tales como: *Vibrio harveryi* y *Vibrio alginolyticus* y más ocasionalmente el *Vibrio pelagius*.

Los *Vibrios* en estos casos suelen detectarse como infecciones secundarias asociadas, pertenecientes al grupo bacilos Gram negativos. Dicha familia se encuentra constituida por bacilos rectos o curvos, móviles por medio de flagelos, requieren de 1 – 3% de NaCl para su crecimiento, es positivo a la prueba de Oxidasa, Catalasa positiva, es sensible al agente Vibriostático 0/129.

Este *V. pelagius* causa enfermedades en los peces principalmente cuando estos están estresados o tienen heridas; en los seres humanos causa diarrea.

En las últimas décadas se ha incrementado notoriamente el interés por el estudio del género *Vibrio*. Es en 1966 cuando el subcomité internacional sobre taxonomía de los *vibrios*, establece una definición para este género bacteriano que supone un avance en su clasificación y estudio. Según una definición, el género *vibrio* esta integrado por bacilos rectos o incubados. Móviles mediante flagelos monotricos o multitricos. La mayor parte son citocromo oxidasa positivo. Generalmente, salvo escasas excepciones fermenta la glucosa con formación de ácidos pero no de gas. Habitualmente



son microorganismos halofílicos y, en todos los casos, los iones sódicos favorecen el crecimiento del género. El mol % Guanina + Citosina (G-C) del DNA es 38-51.

Por lo general, exceptuando el *V. cholera* y *V. mimicus*. Se encuentra en ambientes acuáticos, sobre todo aguas costeras y de estuarios. Especialmente durante los meses más calurosos del año.

Hace relativamente poco tiempo que no se conocían *vibrios* patógenos exceptuando *V. cholera*, así como tampoco los de origen marino hasta que se descubrió en 1951, *V. parahaemolyticus* como un importante microorganismo patógeno humano. A partir de entonces se han descubierto otros *vibrios* marinos igualmente patógenos para el hombre.

En la actualidad existen más de sp dentro del género *vibrio*, de las cuales 9 se han encontrado en muestras clínicas humanas: *V. cholera*, *V. Parahemolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. frunci*, *V. dansela*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*; de todas estas especies, *V. cholera*, *V. parahemolyticus* y *V. mimicus*, se han reconocido como causantes de diarrea o gastroenteritis en el hombre. Desde hace poco tiempo también se consideran como causantes de diarrea las SP: *V. fluvialis*, *V. frunci*, *V. hollisae* y *V. pelagius*.

Los miembros que integran el género *vibrio* son habitualmente organismos marinos, excepto *V. cholera* y *V. mimicus*, debido al hábitat en que se desarrolla, requieren altas concentraciones de sodio, potasio y magnesio. Su crecimiento es pobre en medios de cultivos corrientes con las



tasas de cloruro sódico habituales, mejorando su desarrollo si la tasa de sal se incrementa al 1%.

Los *vibrios* entero patógenos se transmiten al hombre a través del agua o alimento contaminado. El aislamiento de los distintos integrantes del género difiere según la especie de *vibrio* a detectar.

V. parahemolyticus es un germen halofílico marino ampliamente distribuido en el agua de las costas, sedimento marino y planctón, que produce una gastroenteritis aguda.

La especie *V. parahaemolyticus* está integrada por microorganismos de forma bacilar con tendencia al pleomorfismo, existiendo formas cocoides incurvadas y rechonchas, no poseen esporos ni cápsulas, son móviles, con un flagelo, bipolar único aunque en medios sólidos se produce una flagelación peritrica visible con el microscopio electrónico, Gram negativos, con tendencia a la coloración bipolar.

Los microorganismos de esta sp dan una reacción catalasa débilmente positiva. Reacción citocrómica – oxidasa positiva. Producen fermentación anaerogena de la glucosa, sin formación de gas. Fermentan la arabinosa, manosa y manitol. No fermentan la sacarosa, lactosa ni la xilosa. No forman acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer negativos). No producen hidrógenos sulfurados. Forman índol en agua de peptona. Poseen lysina y ornitina descarboxilasa. No poseen arginina dihidrolasa.



V. parahaemolyticus posee tres componentes antigénicos: O, K, Y H. El antígeno flagelado (H) es común a V. parahaemolyticus y V. alginolyticus, el antígeno capsular (K) es un polisacárido termolábil que desaparece por calentamiento a 100<sup>0</sup> C, el antígeno somático (O), es termolábil. Los antígenos somáticos (O) y capsular (K) tienen gran importancia desde el punto de vista epidemiológico.

La patogenicidad de V. parahaemolyticus esta en relación con su capacidad para producir hemólisis sobre un medio especial: Agar Wagatsuma. La producción de esta hemólisis se conoce como fenómeno de Kanagawa. Las cepas aisladas de casos de intoxicación humanas son normalmente Kanagawa negativas. V. parahaemolyticus se asocia ocasionalmente con enfermedades extra intestinales: otitis del oído medio, heridas infectadas.

Para el aislamiento, identificación y recuento de V. parahaemolyticus en alimentos, se han seguido distintas pautas. Entre ellas una de las más generalizadas, se basa en la técnica del número más probable (NMP) utilizando un caldo de enriquecimiento con posterior subcultivo a un medio sólido selectivo. Las colonias aisladas en este último medio son sometidas, posteriormente a confirmación.

Como se trata de una especie bacteriana halofílica, la incorporación de tasas de cloruro sódico apropiadas, favorecen su crecimiento.

En algunos ambientes como el agua de mar la detección de V. parahaemolyticus se hace complicada porque la presencia de V. alginolyticus enmascara sus colonias al crecer en ciertos medios como por ejemplo: T. C. B.



S. Existe un medio en el cual la diferenciación de ambas especies es más clara: T. S. A. (Agar-triptona-soja-tetrazolio).

Partiendo de un cultivo en caldo de enriquecimiento de 18-20 horas, se siembra con asas sobre la superficie bien seca de Agar-triptona-soja-tetrazolio. Incubación a 37<sup>0</sup> C durante 18-20 horas.

Las colonias de *V. parahaemolyticus* son rojo brillantes, mientras que las de *V. alginolyticus* son blancas y más pequeñas. Ocasionalmente pueden presentar unos centros minúsculos de color rojo.

La prueba de Kanagawa tiene por finalidad la detección de hemólisis específicos sobre un agar especial, agar Wagatsuma. La reacción positiva esta relacionada con la patogenicidad de la cepa de *V. parahaemolyticus* aislada.

Las cepas aisladas de casos de toxiinfección por este microorganismo, son siempre Kanagawa positiva, las procedentes de alimentos del mar son Kanagawa negativas.

### **Bacterias del Género *vibrios* y a fines.**

El grupo *vibrios sp* esta colocado junto a las bacterias entéricas, su morfología es bacilar o bacilar curva, aeróbicos facultativos, gram negativos que poseen un metabolismo de fermentación. La mayor parte de los miembros del grupo *vibrios* tienen flagelación polar, aunque algunos miembros están flagelados petricamente. Una diferencia clara entre el grupo *vibrios* y la



bacteria entérica es que los miembros del primero son oxidasa positivos, en tanto que los miembros del último son oxidasa negativos.

Estos microorganismo son de hábitat marino, a excepción de *Vibrios cholerae* y *Vibrios mimicus*, habitan en los estuarios de todo el mundo, no necesitan requerimientos nutricionales exigentes para su desarrollo, móviles por medio de flagelos polares, tienen metabolismo respiratorio fermentativo y se desarrollan mejor en medios alcalinos entre PH de 7.6 a 9.0. Tienen afinidad por la sal, es decir son halófilas ya que requieren por lo menos 1% de Cloruro de Sodio para su óptimo crecimiento y tienen un tiempo de generación entre los 9 y 15 minutos.

Las especies de *Vibrios* asociadas a infecciones de especies marinas son por lo general el *Vibrios parahaemolyticus*, *alginolyticus*, *anguillarum* y *algosus*. Tienen la propiedad de afectar a todos los estadios de desarrollo del camarón, provocando rangos de mortalidades variables que dependen del sitio u órgano infectado, de tal forma que si la infección es localizada en la cutícula el rango de mortalidad es bajo, mientras que en infecciones internas o sistemáticas las mortalidades son del 100% a las 24 horas de aparecida la infección.

El género *Vibrio* se caracteriza por una reacción más el agente vibriostático 0/129, la cual consistió en inhibición del crecimiento de la bacteria, observándose la formación de un halo.



### **3.4 -) Condiciones Físicas y Químicas del Metabolismo Bacteriano.**

#### **3.4.1 -) Temperatura.**

Todos los microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento. Esto significa que a determinada temperatura la velocidad de duplicación (o la velocidad de crecimiento poblacional) de los microorganismos es mayor. En el rango siguiente se presentan los rangos de temperatura en los que pueden crecer los microorganismos bacterianos:

<b>Clasificación</b>	<b>Rango</b>	<b>Óptima</b>
<b>Termófilos</b>	25 – 80 °C	50 – 60 °C
<b>Mesófilos</b>	10 – 45 °C	20 – 40 °C
<b>Psicrófilo</b>	-5 – 30 °C	10 – 20 °C

La temperatura afecta la estabilidad de las proteínas celulares porque induce cambios conformacionales que alteran la actividad biológica de estos compuestos, especialmente la de enzimas.

#### **3.4.2 -) pH:**

La mayoría de los microorganismos crecen en pH cercanos a la neutralidad, entre 5 y 9, cosa que no excluye que existan microorganismos que puedan soportar pH extremos y se desarrollen, como se observa a continuación en el siguiente cuadro:





<b>Clasificación</b>	<b>PH Externo</b>	<b>PH Interno</b>
<b>Acidófilos</b>	1.0 – 5.0	6.5
<b>Neutrófilos</b>	5.5 – 8.5	7.5
<b>Alcalófilos</b>	9.0 – 10.0	9.5

Los microorganismos regulan su pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP dependiente.

El rango de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos es estrecho debido a que frente a un pH externo muy desfavorable se requiere un gran consumo de energía para mantener el pH interno.

### **3.4.3 -) Actividad del Agua.**

El agua es el solvente en donde ocurren las reacciones químicas y enzimáticas de la célula y es indispensable para el desarrollo de los microorganismos.

La actividad de agua del medio presenta la fracción molar de las moléculas de agua totales que están disponibles, y es igual a la relación que existe entre la presión de vapor de la solución respecto a la del agua pura (p/po). El valor mínimo de la actividad agua en el cual las bacterias pueden crecer varía ampliamente, pero el valor óptimo para muchas especies es mayor a 0.99. Algunas bacterias halófilas (bacterias que se desarrollan en altas concentraciones de sal) crecen mejor con agua = 0.80.



Variaciones en la actividad de agua puede afectar la tasa de crecimiento, la composición celular y la actividad de metabólica de la bacteria, debido a que si no dispone de suficiente cantidad de agua libre (no asociada a solutos, etc) en el medio necesitaran realizar más trabajo para obtenerla y disminuirá el rendimiento del crecimiento.

#### **3.4.4 -) Potencial de Oxido-Reducción.**

El potencial de Oxido-Reducción es zuna medida de la tendencia del medio a donar o recibir electrones. Es critico para el crecimiento de los microorganismos y generalmente está asociado con la presencia de oxigeno molecular disuelto en el medio el cual es muy oxidante. En medios que contienen oxigeno, en condiciones similares a las atmosféricas, el potencial redox varía entre 0.2 y 0.4 Voltios. Los anaerobios estrictos necesitan una atmósfera sin oxigeno pues deben crecer en medios reductores donde el potencial no sea mayor a -0.2 Voltios. Sin embargo, potenciales redox positivos creados por la presencia de otras sustancias químicas no afectan el crecimiento de los anaerobios más estrictos, aunque muchos anaerobios estrictos son inhibidos por potenciales mayores a -0.100 mV.

#### **3.4.5 -) Requerimientos Nutritivos.**

##### **3.4.5.1 -) Carbono.**

Este elemento puede aportarse a los microorganismos en forma muy diversa dependiendo del tipo de metabolismo que posean. El carbono es utilizado por los microorganismos para sintetizar los compuestos orgánicos requeridos para las estructuras y funciones de la célula.



Los microorganismos se pueden dividir en categorías nutricionales en base a dos parámetros: naturaleza de la fuente de energía y naturaleza de la fuente principal de carbono.

- \* **Fotoautotrofos:** Dependen de la luz como fuente de energía y utilizan CO<sub>2</sub> como principal fuente de carbono. Vegetales superiores, bacterias fotosintéticas, algas eucarióticas, etc.
  
- \* **Fotoheterotrofos:** Utilizan luz como fuente de energía y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono. Algunas bacterias fotosintéticas y algas eucarióticas.
  
- \* **Quimioautotrofos:** Utilizan CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y emplean fuentes de energía química proveniente generalmente de compuestos inorgánicos reducidos (H<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, etc).
  
- \* **Quimioheterotrofos:** Utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Los compuestos orgánicos también se comportan como fuente de electrones. Este grupo está integrado por animales superiores, hongos, protozoos y la mayoría de las bacterias.

#### **3.4.5.2 -) Nitrógeno.**

El nitrógeno es utilizado por las bacterias para formar aminoácidos, pirimidinas, purinas, etc, y puede provenir de fuentes diferentes:



- \* **Asimilación de  $\text{NH}_3$  y Sales de Amonio:** El nitrógeno es transferido con este estado de oxidación a los aminoácidos por la vía de la glutamato/glutamina.
  
- \* **Fijación de Nitrógeno:** El  $\text{N}_2$  es reducido dentro de la célula a  $\text{NH}_4^+$  y metabolizado.
  
- \* **Reducción Asimiladora de Nitratos:** Los nitratos son reducidos dentro de la célula por la vía de los nitritos a  $\text{NH}_3$  y metabolizado.
  
- \* **Hidrolizados Proteicos:** Los microorganismos incapaces de asimilar el nitrógeno de sales inorgánicas, lo obtienen a través de compuestos orgánicos nitrogenados como los hidrolizados proteicos.

Estos compuestos proteicos son a su vez hidrolizados por enzimas bacterianas, fuera de la célula, a aminoácidos, los que después son metabolizados dentro de la célula.

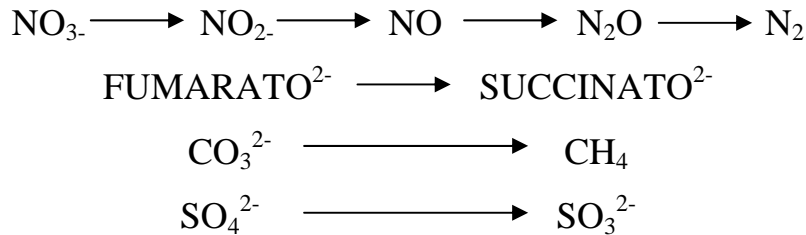
#### **3.4.5.3 -) Oxígeno.**

Basados en los requerimientos de oxígeno molecular las bacterias se pueden dividir en 5 grupos:

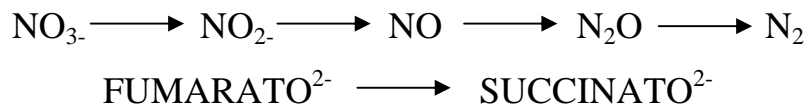
- \* **Aerobios Obligados:** Requieren oxígeno para el crecimiento pues dependen de este elemento para cubrir sus necesidades energéticas. El oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria.



- \* **Anaerobios Obligados:** Crecen en ausencia total de oxígeno porque necesitan de un medio muy reductor. Utilizan respiración anaerobia donde los aceptores finales de electrones pueden ser generalmente  $\text{SO}_4^{2-}$ , Fumarato<sup>2-</sup> o  $\text{CO}_3^{2-}$ .



- \* **Anaerobios Facultativos:** Pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria cuando está disponible, y en ausencia de oxígeno la energía la obtienen por fermentación o respiración anaerobia (generalmente el  $\text{NO}_3^-$  es un aceptor final de electrones en las enterobacterias).



- \* **Anaerobios Aerotolerantes:** Pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero la energía la obtienen por fermentación.
- \* **Microaerofilos:** Sólo pueden crecer con bajas tensiones de oxígeno porque las altas tensiones son tóxicas para este tipo de microorganismos (1 a 12% de  $\text{O}_2$  en la fase gaseosa). La energía la obtienen por respiración aeróbica, cuando no hay aceptores electrónicos terminales alternativos, o anaeróbica.



### **3.5 -) Estructura Celular.**

#### **3.5.1 -) Pared Celular.**

Una de las características estructurales más importantes de la célula procariótica es la pared celular que le confiere rigidez y forma.

Las células gram positivas y gram negativas difieren considerablemente en la estructura de sus paredes celulares. La pared celular gram negativa es una estructura pluriestratificada y muy compleja, mientras que la pared celular gram positiva consiste en una única capa y a menudo mucho más gruesa.

La capa rígida de las bacterias gram negativas y gram positivas es muy similar en su composición química. Esta capa llamada glucopeptido es una hoja delgada compuesta de dos derivados de azúcares, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, y además, un pequeño grupo de aminoácidos constituido por L-alanina, ácido D-glutámico o bien lisina o bien ácido diaminopimélico (DAP). Estos constituyentes están conectados y forman una estructura repetitiva, el glucotetrpeptido, que es polimerizado y forma la capa glucopeptida.

La estructura básica es en realidad una hoja delgada en la que las cadenas de glucano formadas por los azúcares están conectados por enlaces cruzados peptídicos formados por los aminoácidos. En las bacterias gram negativas la conexión transversal tiene lugar normalmente por un ligamento o enlace peptídico directo del grupo amino del ácido diaminopimélico con el grupo carboxilo de la D-alanina terminal.



En las bacterias gram negativas sólo de un 5% a un 20% de la pared celular es glucopeptido, y el resto de la pared consiste en lípidos, polisacáridos y proteínas generalmente presentes en una capa al exterior de la capa de glucopeptido. En algunas bacterias gram negativas estos constituyentes existen en forma de una capa que es una verdadera membrana elemental.

La membrana elemental de la pared externa no consiste únicamente en fosfolípidos, como la membrana plasmática sino que contiene además lipopolisacárido en el que la parte hidrófila consiste en azúcares y la parte hidrófoba consiste en un lípido de estructura única.

### **3.5.2 -) Membrana Celular.**

La membrana plasmática es una delgada estructura que rodea por completo a la célula. Los principales componentes de esta son fosfolípidos y proteínas. Los fosfolípidos forman la estructura básica de la membrana. La molécula de fosfolípidos se dispersa en el agua de tal forma que los grupos insolubles en el agua (hidrófobos) se asocian por un lado y los grupos iónicos (hidrófilos) se asocian por otro lado, lo cual conduce a la formación de una membrana bioestratificada. Las proteínas principales de la membrana son hidrófobas y se asocian y quedan embebidas en la matriz fosfolípida. Las moléculas de proteínas están también ligadas a los grupos iónicos de fosfolípidos. La estructura de la membrana plasmática es estabilizada principalmente por enlaces de hidrógeno e hidrófobos. No obstante cationes como el  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  se combinan también con algunas de las cargas negativas de los fosfolípidos y contribuyen a estabilizar la estructura de la membrana.



## **Membrana Plasmática como Barrera de Permeabilidad.**

Los grupos acil-grasos, de los fosfolípidos, de la membrana están en constante movimiento y posiblemente produce poros en la membrana para abrir y cerrar. Cuando un poro está abierto, el agua y muchas moléculas no cargadas, disueltas en el agua, pueden pasar a través, mientras que cuando el poro está cerrado la penetración de los materiales solubles en el agua es imposible.

Para las moléculas ionizadas tales como los ácidos orgánicos, los aminoácidos y las sales inorgánicas existe otra barrera a la penetración, debido a que las moléculas ionizadas son repelidas por la carga eléctrica sobre la superficie de la membrana. Por otro lado, las sustancias solubles en grasa tales como los hidrocarburos y los ácidos grasos no cargados penetran rápidamente en las células al ser disueltos en la fase lípida de la membrana.

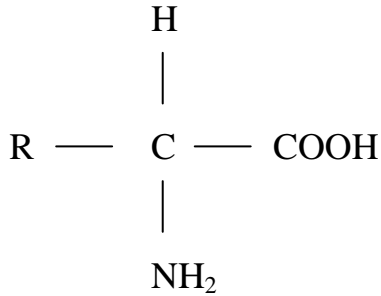
### **3.5.3 -) Bioquímica Microbiana.**

#### **3.5.3.1 -) Aminoácidos.**

Estos constituyen el alfabeto de la estructura proteica y determinan muchas de las propiedades importantes de las proteínas. Además de los 20 aminoácidos hallados como sillares de las proteínas, otros muchos aminoácidos presentes biológicamente desempeñan otras funciones en las células.

La forma estructural general de los 20  $\alpha$ -aminoácidos hallados correctamente en las proteínas, llamadas también aminoácidos corrientes, es por ejemplo:

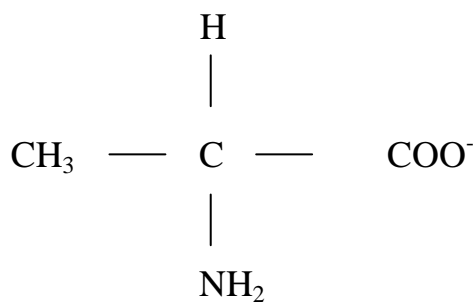




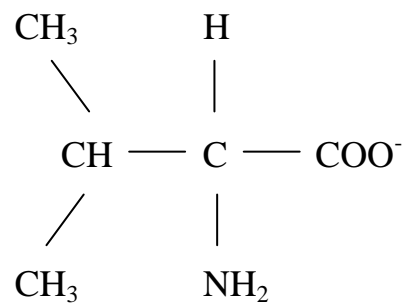
Se han propuesto varios métodos para clasificar los aminoácidos sobre la base de sus grupos R, el más significativo es el que se fundamenta en la polaridad de sus grupos R.

### 3.5.3.2 -) Aminoácidos con grupo R no polares.

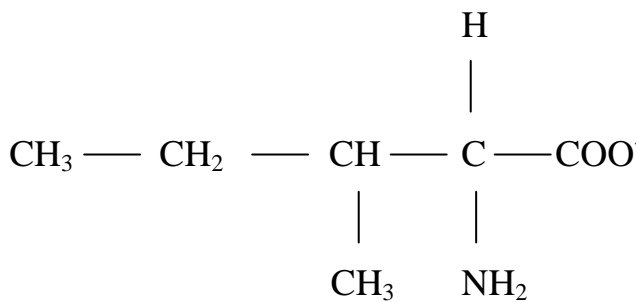
Esta familia contiene 5 aminoácidos con grupos R que son hidrocarburos alifáticos, 2 con anillos aromáticos y uno con azufre.



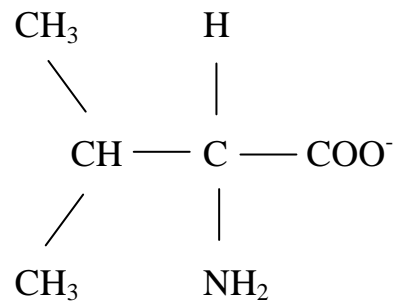
**Alanina**



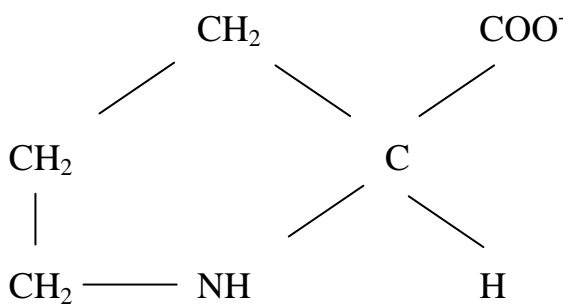
**Leucina**



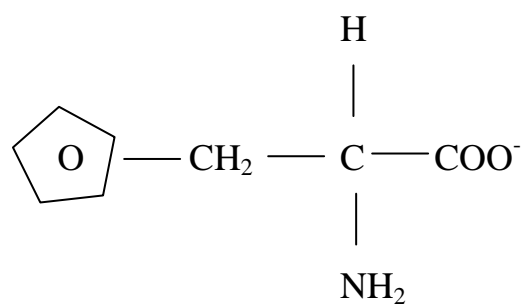
**Isoleucina**



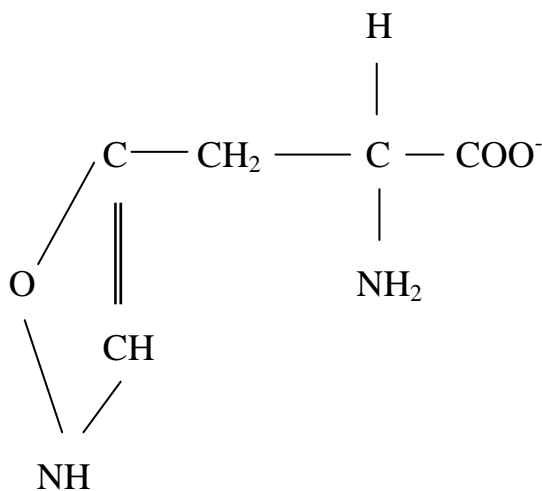
**Valina**



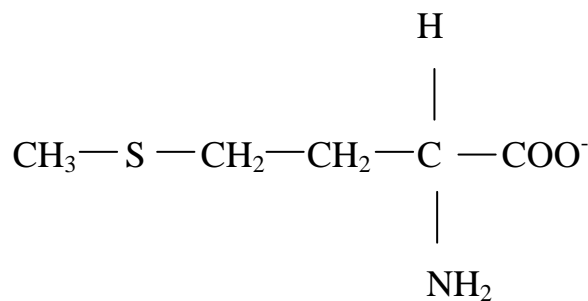
**Prolina**



**Fenilalanina**



**Triptofano.**



**Metionina.**

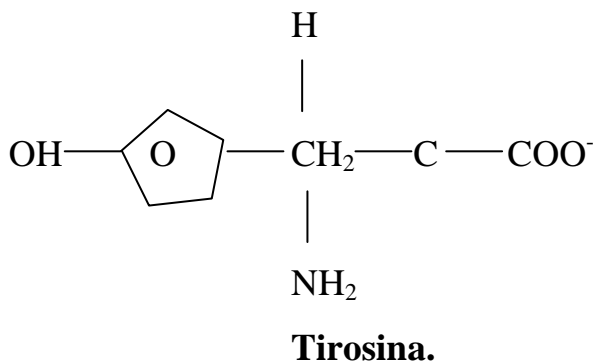
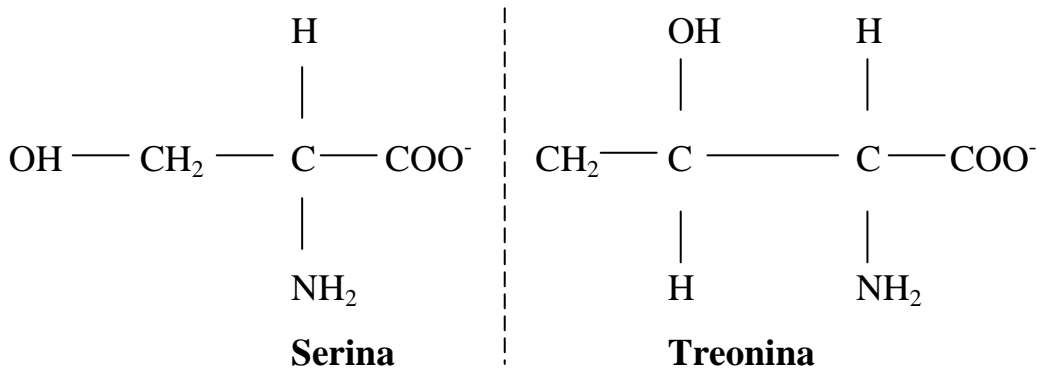
Estos aminoácidos son menos solubles en el agua que los aminoácidos con grupos R polares y el miembro menos hidrófobo de esta familia es la alanina.

### 3.5.3.3 -) Aminoácidos con grupos R polares sin carga.

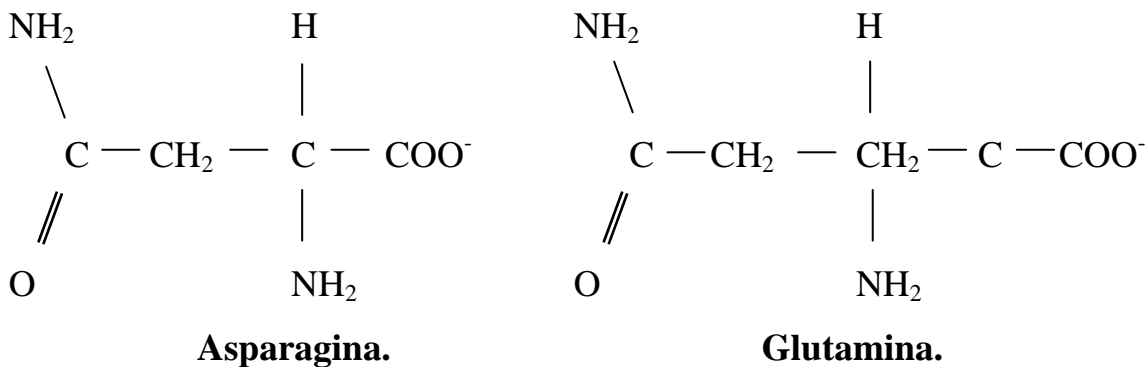
Estos son relativamente más solubles en el agua que los aminoácidos con grupos R no polares. Sus grupos R contienen grupos funcionales polares



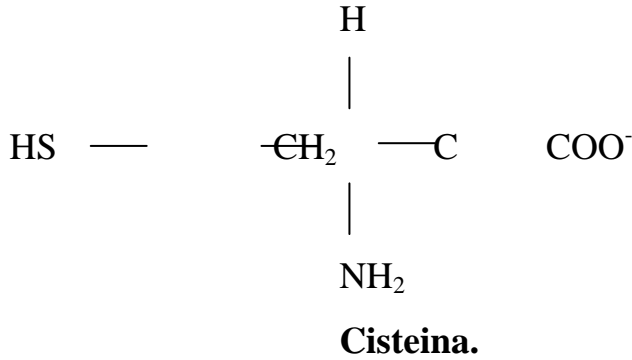
neutros que pueden establecer enlaces de hidrógeno con el agua, y esta familia consta de siete aminoácidos.



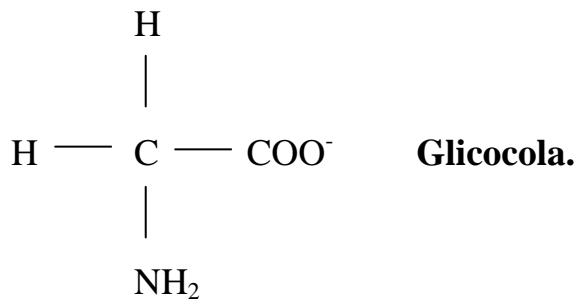
La polaridad de estos aminoácidos se debe a sus grupos hidroxilo.



La polaridad de estos aminoácidos se debe a sus grupos anhídricos.



La polaridad se debe a su grupo sulfídrico.



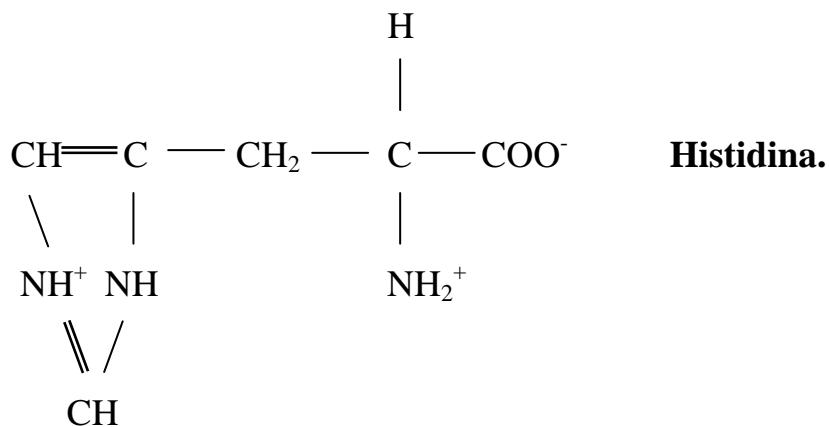
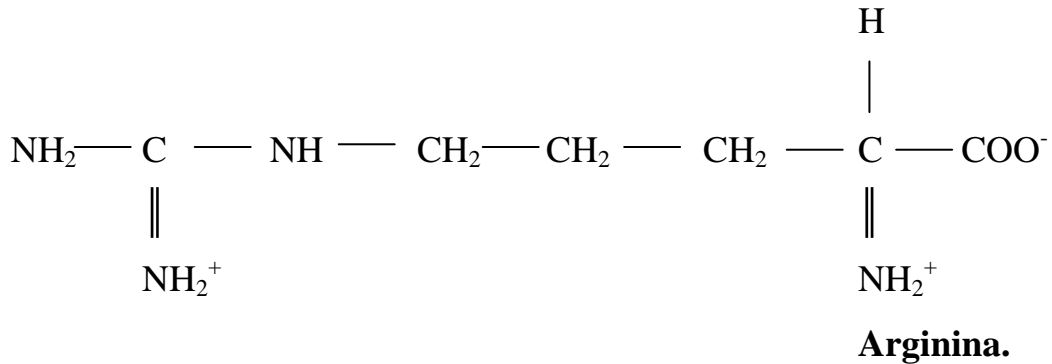
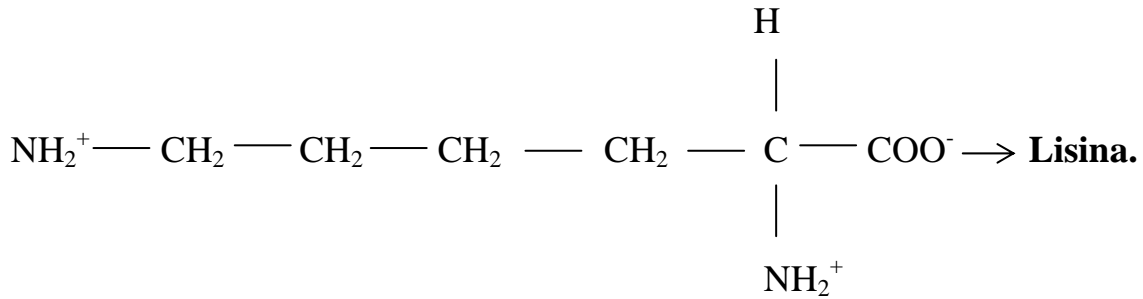
Este aminoácido es el término fronterizo de este grupo, se clasifica a veces como un aminoácido no polar pero su grupo R, que es un átomo de hidrógeno, es demasiado pequeño para que pueda influir en la elevada polaridad de los grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo.

### 3.5.3.4 -) Aminoácidos con grupos R cargados positivamente.

Los aminoácidos básicos en los que los grupos R poseen carga positiva neta a PH 7 poseen todos seis átomos de carbono. Están constituidos por la lisina, que contiene un segundo grupo amino en  $\delta$  de la cadena alifática. La arginina que tiene un grupo guanidinio cargado positivamente y la histidina que contiene la función imidazolio, débilmente básica. La histidina posee



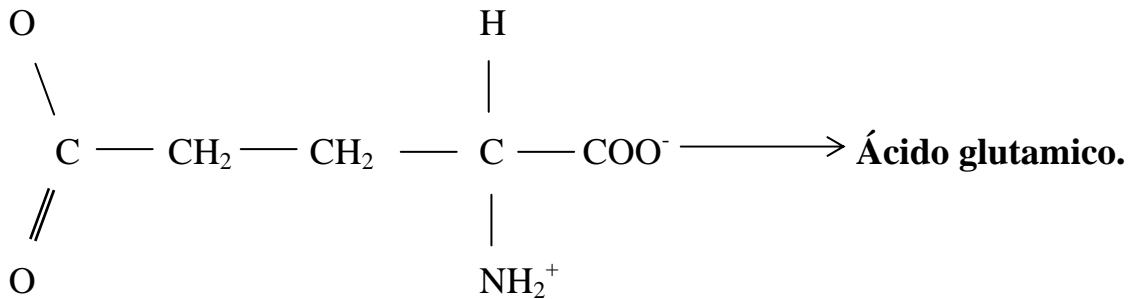
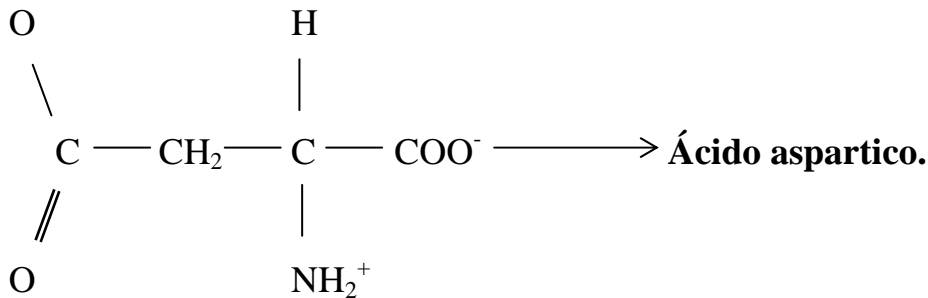
propiedades límites, a PH 6 más del 50% de las moléculas de histidina poseen un grupo R cargado positivamente, pero a PH 7 menos del 10% de las moléculas poseen carga positiva.





### 3.5.3.5 -) Aminoácidos con grupos R cargados negativamente.

Los dos miembros de esta clase son los ácidos aspárticos y glutámico, cada uno de los cuales posee un segundo grupo carboxilo que se halla completamente ionizado y, por tanto, cargado negativamente de PH 6 a 7.



### 3.5.4 -) Metabolismo de los Aminoácidos.

Cuando los aminoácidos son utilizados como fuente de carbono, por lo general la primera transformación que tiene lugar es la eliminación del grupo amino convirtiéndose así el aminoácido en un ácido orgánico. Las reacciones que añaden o quitan grupos aminos comprenden al coenzima piridoxal-fosfato, que activa al grupo amino de forma que puede ser eliminado de varias maneras:



- \* **Transaminación:** Es la manera más simple y probablemente la más común en los microorganismos, aquí el grupo amino es cambiado por el grupo ceto de un cetoácido dando un aminoácido diferente.
  
- \* **Deshidrogenación:** Es una reacción de oxidación-reducción que implica el uso de un coenzima, por lo general NAD. En la deshidrogenación el aminoácido es convertido así mismo en un cetoácido, pero en contraste con la transaminación, el grupo amino no es conservado en otro aminoácido, sino que es convertido en amoníaco.

Los aminoácidos pueden también ser utilizados después de una descarboxilación en la cual el grupo carboxilo es convertido en CO<sub>2</sub> y el aminoácido en una amina. Puesto que cada uno de estos modos de actuar sobre un enzima requiere la presencia de enzimas específicas en el organismo, diferentes organismos pueden degradar un aminoácido de maneras diferentes, y un organismo puede tener más de un mecanismo.

#### **3.5.4.1 -) Proteínas.**

Son las moléculas orgánicas más abundantes en las células, constituyendo el 50% o más de su peso seco. Se encuentran en todas partes de las células ya que son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y funciones celulares. Existen muchas clases de proteínas diferentes, cada una de ellas especializada en una función biológica diferente.



Las proteínas están compuestas por carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, aunque casi todos contienen azufre, otras contienen algunos elementos adicionales, particularmente fósforo, hierro, zinc y cobre.

En las moléculas proteicas los sucesivos restos aminoácidos se hallan unidos covalentemente entre sí, formando largos polímeros no ramificados. Están unidos en una ordenación de cabeza a cola mediante uniones amida sustituida, llamada enlace peptídico, producido por eliminación de los elementos del agua entre el grupo carboxilo de una aminoácido y del grupo  $\alpha$ -amino del siguiente. Estas macromoléculas, que reciben el nombre de polipéptidos, pueden contener centenares de unidades de aminoácidos.

### **3.6 -) Pruebas Bioquímicas para Caracterización de *Vibrios*.**

#### **3.6.1 -) Prueba de Voges-Proskauer.**

El medio VP-MR Ref. 2-207 se trata del clásico medio de cultivo líquido para llevar a cabo los ensayos diferenciales de Voges-Proskauer y rojo de metilo, correspondientes al IMViC de las colimetrías. (I = Indol; M = Rojo de Metilo; V = Voges-Proskauer; C = Citrato) que permiten la diferenciación del grupo coli y aerogenes. El fundamento de dichas reacciones es el siguiente:

#### **1.6.2 -) Prueba del Rojo de Metilo.**

Dentro de las entero bacterias, el grupo E. Coli fermentan la glucosa por la llamada vía ácido mixta, produciendo un acumulo de productos ácidos que provocan un fuerte descenso del PH inicial del medio de cultivo; puede





detectarse por el viraje del indicador de rojo de metilo que permanece amarillo por encima del PH 5.1 y rojo por debajo del PH 4.4

Las entero bacterias del grupo klebsiella-Enterobacter (antiguo aerogenes) fermentan la glucosa por un camino metabólico conocido como: vía del 2-3-butanodiol, en la cual si bien se producen productos ácidos, dominan al final los neutros o alcalinos. Por ese motivo la incubación debe prolongarse hasta 3 días al termino de los cuales la reacción del rojo de metilo es ya negativa.

Sin embargo la prueba de Voges-Proskauer que en cierto aspecto es complementaria a la del rojo de metilo, consiste en poner de manifiesto la producción de 2-3-butanodiol y acetoina, que en la vía ácido mixta difícilmente llegan a acumularse. Para ello se aprovecha el fenómeno de que estos dos productos en medio alcalino se oxidan a diacetilo que a su vez reacciona con la guanidina y produce unos compuestos coloreados fácilmente visibles al ojo humano.

Prueba de Voges-Proskauer en *Vibrios*, en medio de cultivo, Medio Fluido Ref. 3-375. Para la lectura se mezclan dos partes de la solución de  $\alpha$ -naftol (Ref. 6-027) y una parte de reactivo de O'Meara (Ref. 6-006), y se añaden 0.5 ml de la mezcla al tubo. Al cabo de unos minutos la reacción positiva se manifiesta por la aparición de un color rojo (gram positiva).



### **3.6.3 -) Prueba de Indol.**

Muchos microorganismos pueden producir Indol (= benzopirrol) a partir del triptofano gracias a una triptofanasa, en un proceso que se favorece con la presencia de oxígeno y se inhibe con la glucosa. Por este motivo se recomienda que los medios utilizados para esta prueba estén exentos de glucosa, con una abundante fuente de triptofano y se incuben aeróbicamente.

La capacidad productora de Indol constituye una prueba clásica para la diferenciación de *Escherichia coli* y *Enterobacter*, además que para algunas especies de *Vibrios*, integrada en el IMViC, pero además se utiliza con mucha frecuencia en la identificación de otros microorganismos no entéricos.

La detección del Indol se puede llevar a cabo por distintas metodologías, pero en definitiva, las bases bioquímicas de la reacción son siempre las mismas. Cuando un pirrol se mezcla con una solución alcohólica de p-imetilaminobenzaldehído en caliente, se desarrolla una coloración roja cereza característica (rosindol). Si la solución del reactivo se hace además con HCl concentrado no es necesario que curse en caliente.

El reactivo que inicialmente se utilizó fue el de Ehrlich-Bohme, con una extracción y concentración previa en xileno, éter, cloroformo o tolueno. Posteriormente, Kovac modificó el reactivo inicial sustituyendo el etanol por alcohol amílico con lo cual se hacía innecesaria la extracción previa, y en 1956, Adenbusch y Gabriel demostraron que el reactivo de Kovac era mucho más estable si en lugar del alcohol amílico se utilizaba butílico o isoamílico.



### **3.6.4 -) Tinción de Gram.**

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen primero con una solución de cristal violeta (otros colorantes básicos no son tan efectivos) y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En esta estado, teñidas todas las células, tanto las gram positivas como las gram negativas, están teñidas de azul. El portaobjeto se cubre entonces con una solución de yodo ( $I_2$ )-yoduro potásico (KCl). El ingrediente activo aquí es el  $I_2$ ; el KI simplemente hace soluble el  $I_2$  en agua. El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células gram positivas como las gram negativas se encuentran en la misma situación. Se lleva a cabo después de la coloración, usando bien alcohol o bien cetona, sustancias en la que es soluble el complejo  $I_2$ -cristal violeta.

Algunos organismos (gram positivos) no se decoloran, mientras que otros (gram negativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración. Después de la decoloración las células gram positivas son todavía azules, pero las gram negativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células gram negativas se utiliza una decoloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la decoloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen azules.

Deben destacarse dos aspectos cruciales de la tinción de Gram:



- 1- El tratamiento con cristal violeta debe preceder al tratamiento con yodo. El yodo por si sólo tiene poca afinidad con las células.
  
- 2- La decoloración debe realizarse con poco agua para evitar que pierdan la tinción las células gram positivas. El proceso de decoloración debe de ser corto y es esencial un cálculo preciso del tiempo para obtener resultados satisfactorios. Finalmente el carácter de gram positivo no es siempre un fenómeno del todo o nada. Algunos organismos son más gram positivos que otros, y algunos son variables, es decir, unas veces gram positivos y otras veces gram negativos.

### **3.6.5 -) Fundamento de la tinción de Gram.**

Nótese que en la reacción de gram se forma un complejo insoluble cristal violeta-yodo en el interior de la célula y que este complejo es extraído con alcohol de las bacterias gram negativas, pero no de las gram positivas.

Las bacterias gram positivas tienen paredes celulares muy gruesas que se deshidratan con la acción del alcohol. Esto hace que se cierren los poros de las paredes, impidiendo así que se escape el complejo insoluble cristal violeta-yodo. No obstante, la reacción de Gram no está relacionada directamente con la química de las paredes celulares bacterianas, ya que las levaduras, que tienen una gruesa pared celular pero una composición química completamente diferente, son también gram positivas. Por tanto, no son los constituyentes químicos, sino la estructura física de la pared lo que le confiere la gram positividad.



### **3.6.6 -) Prueba de Oxidasa.**

La prueba de oxidasa esta basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular. El que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor de hidrógeno agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana y su sistema enzimático.

El sistema citocromo sólo se encuentra por lo general en los organismos aeróbicos, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno como un aceptor de hidrógeno final para reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno, el último enlace de la cadena de la respiración aeróbica. Steel demostró que todos los organismos oxidasa positivos que estudió era aeróbicos, o anaeróbicos facultativos, excepto el *Vibrio fetus*, que tiene un requerimiento de oxígeno microaerofílico. Gordón y McLeod aseguran que la reacción oxidasa positiva está limitada a aquellos organismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno y producir, al mismo tiempo, la enzima catalasa. La enzima catalasa degrada el peróxido de hidrógeno, dado que su acumulación es tóxica.



Los organismos obligatoriamente anaeróbicos carecen de actividad oxidasa porque no pueden vivir en presencia del oxígeno atmosférico y no poseen el sistema citocromooxidasa. Deibel y Evans mostraron también esta ausencia de actividad enzimática en la *Lactobacillus*.

Poco se sabe acerca de la función exacta de los diversos citocromos bacterianos, ya que el sistema citocromooxidasa varía entre las especies bacterianas. Sin embargo, es sabido que su papel en la respiración aeróbica es importante.

### **3.6.7 -) Caldo VPRM.**

Este medio se utiliza para la realización de la prueba de Voguer-Proskauer. Esta prueba consiste en poner de manifiesto la producción de 2-3-butanodiol y acetoína, que en la vía ácido mixta difícilmente llegan a acumularse. Para ello se aprovecha el fenómeno de que estos dos productos en medio alcalino se oxidan a diacetilo que a su vez reacciona con la guanidina y produce unos compuestos coloreados fácilmente visibles al ojo humano.

### **3.6.8 -) O/F, Medio Fluido.**

Hugh y Leifson, con este medio hicieron una clara diferenciación de las bacterias gram negativas en tres categorías: Fermentadoras, oxidadoras e inactivas. Por se inocula la cepa a ensayar en dos tubos largos y estrechos (12 x 120) mediante picadura profunda y uno de ellos se cubre con una capa de vaselina, para provocar un ambiente anaerobio que obligue a fermentar.



Los organismos fermentadores dan una gran abundante producción de ácido en ambos tubos, que se manifiesta por un viraje amarillo del indicador.

Los oxidativos sólo producen esta reacción en el tubo sin vaselina, sin cambio a penas o a veces sin crecimiento en el tubo cerrado.

Los inactivos son aquellos que no utilizan los azucres y que no provocan cambios en los tubos o tan sólo un ligero azulamiento en el abierto, probablemente por la alcalinización de vida a la degradación de la peptona.

### **3.6.9 -) Agar Mueller-Hinton.**

Se utiliza para el ensayo de la sensibilidad o para ensayos de resistencia de agentes patógenos. Algunos autores prefieren la modificación del inóculo, consistente en hacer una doble capa del medio inoculado en masa; indudablemente este sistema proporciona halos más nítidos y definidos.

### **3.6.10 -) Descarboxilasa Lysina.**

Medio para diferenciación entérica con los ensayos de descarboxilar ciertos aminoácidos se ha utilizado ampliamente para la clasificación de *anterobacteriaceae*.

Se recomienda la utilización de un cierre de vaselina para evitar la oxidación espontánea, la utilización de la glucosa en condiciones anaeróbicas determinan la acidificación del medio que virará a amarillo siempre que exista crecimiento.



La utilización del aminoácido volverá a alcalinizar el medio que paulatinamente vira a gris y finalmente a violeta que marca la reacción positiva, la lectura de esta prueba bioquímica.

### **3.6.11 -) Arginina.**

Caldo para la determinación de la producción de amoníaco que da buenos resultados para los estreptococos y otras bacterias aunque sean exigentes. Entre los estreptococos la producción de amoníaco a partir de la Arginina es negativa.

## **3.7 -) Aislamiento y Depuración del Crecimiento Bacteriano.**

### **3.7.1 -) Medios de Cultivo.**

Los medios de cultivo son una mezcla equilibrada de nutrientes que en concentraciones adecuadas y con condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Contienen una base mineral, fuente de carbono, nitrógeno y azufre; atmósfera adecuada y los factores de crecimiento adecuados.

- **Medio sintético:** Son los medios que contienen una composición química definida cualitativa y cuantitativamente. Se utilizan para el estudio de requerimientos nutricionales y para obtener resultados reproducibles.





- **Medio Mínimo:** Son los medios que presentan la mínima cantidad de nutrientes capaz de permitir el desarrollo de los microorganismos.
- **Medio Complejo:** Medios que contienen nutrientes de composición química variable o no establecidas. Son mezcla complejas y poco definidas de sustancias. Se forman a partir de extractos animales, vegetales, etc.

Se utilizan cuando se necesita obtener una amplia gama de microorganismos.

- **Medio Enriquecido:** Medio que tiene un gran exceso de nutrientes y se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales. No pueden ser selectivos. Agar chocolate, agar cerebro-corazón, etc.
- **Medio Selectivo:** Medio que sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibe el de otros. Permite seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos *Staphilococcus*).
- **Medio Diferencial:** Medio que permite revelar características fisiológicas de los microorganismos. Levine (permite visualizar la fermentación de lactosa por viraje de un indicador ácido-base), Agar sangre (permite visualizar la síntesis de hemolisinas).



### **3.8 -) Enriquecimiento.**

Es una técnica que permite el desarrollo de un grupo de microorganismos a partir de una muestra que contiene una gran variedad de microorganismos. Se utiliza un medio selectivo líquido para favorecer la competencia entre los organismos y se incuban bajo determinadas condiciones.

Aquellos microorganismos para los que el ambiente sea más favorable crecerán más que los otros y finalmente serán predominantes.

#### **3.8.1 -) Agar TCBS.**

Este medio de cultivo es especialmente recomendado para el aislamiento selectivo de *Vibrios* que provocan afecciones coléricas, diarrea, disentéricas y el examen de alimentos sospechosos de portadores de los mismos. Actualmente está aceptado de forma universal como el mejor para el aislamiento diferencial de vibriones enteropatógenos, consiguiendo una fuerte inhibición de toda la flora acompañante. Su formulación permite un abundante crecimiento de *Vibrios cholerae* y *Vibrios parahaemolyticus*. También crecen en este medio de cultivo *V. alginolyticus* y los *Vibrios* NAG.

Las enterobacterias quedan fuertemente reprimidas por las elevadas concentraciones de citrato, o tiosulfato, bilis y cloruro sódico. Los únicos gérmenes que pueden prestarse a confusión son algunos biotipos de proteus y pseudomonas. Excepcionalmente pueden aparecer colonias muy pequeñas y amarillas que corresponden a Enterococos resistentes.



#### **IV -) METODOLOGÍA.**

El estudio se realizó en el Balneario de Las Peñitas en el sector del Estero: Ubicado al Sur del Balneario de Poneloya, Sutiava. En un período comprendido entre Enero a Septiembre del 2003.

El muestreo se realizó en el Estero donde se tomaron muestras representativas y confiables. Las recolectas de las muestras microbiológicas se realizó en botellas de vidrio con capacidad de 500 ml que antes de ser utilizadas eran esterilizadas en autoclave a una atmósfera por 15 minutos. Cada muestra se tomó cuidadosamente introduciendo con mucho cuidado las botellas al estero. Las muestras se realizaron a las diez de la mañana, a una profundidad de ½ - 1 metro trayendo una muestra de profundidad y otra de superficie, con un pH entre 8.15 - 8.30.

Se tomaron todas las precauciones que nos garantizarán que las muestras fueran representativas del agua examinada y que no se presentara accidentalmente contaminación durante el muestreo.

Las muestras fueron conservadas en lugares oscuros y frescos y transportaron al laboratorio donde se analizaron. Una vez que la muestra fue recolectada se dejó un espacio de aire amplio en la botella para guardar oxígeno y para poder homogenizar la muestra para luego proceder al montaje. El muestreo se realizó tomando una muestra cada mes durante todo el período.



#### **4.1 -) Preparación de Medios de Cultivos y Pruebas Bioquímicas.**

**4.1.1 -) Agar T: C. B. S.:** Se suspende 8.8 gramos de polvo del medio de cultivo en 100 ml de agua destilada adicionando 1 gramo de cloruro de sodio. Luego verter en placas descartables.

**4.1.2 -) Agar T. S. A.:** Se agregan 4 gramos de medio de cultivo en 100 ml de agua y se le adiciona 1 gramo de cloruro de sodio, se mezcla y se pone en ebullición hasta alcanzar disolución completa. Este medio es esterilizado en auto clave a 121 °C por 15 minutos. Para verter en platos petri dejándolo enfriar hasta que el medio se ponga sólido.

#### **4.1.3 -) Tinción de Gram:**

- En un portaobjeto agregar una gota de agua destilada.
- Se toma una colonia con el asa de siembra y se frota en el portaobjeto.
- Dejar secar el contenido del portaobjeto.
- Se aplica al portaobjeto Azul de Metileno por dos minutos.
- Se lava con agua destilada.
- Se aplica lugol y se deja por un minuto.
- Decolar con etanol por treinta segundos.
- Lavar con agua destilada.
- Cubrir con safranina por dos minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Secar y mirar con aceite de inmersión.



#### **4.1.4 -) Prueba de Catalasa.**

- En un portaobjeto se deposita una gota de agua oxigenada.
- Con ayuda del asa de siembra se toma una colonia típica.
- Se deposita en la gota de agua oxigenada.

#### **4.1.5 -) Prueba de Oxidasa.**

- En una placa petri limpia se deposita un disco de papel filtro con el reactivo de la oxidasa.
- Se toma una colonia y se dispersa sobre el papel con el reactivo.

#### **4.1.6 -) Prueba de motilidad:**

- En un portaobjeto se depositó una gota de agua destilada al 1% NaCl.
- Luego se toma una colonia y se sumerge en agua destilada al 1%.
- Se le pone un cubre objeto y se observa al microscopio.

#### **4.1.7 -) IMViC.**

- **Agua peptonada:** Se disuelven 0.38 gramos de agua peptonada en 15 ml de agua destilada al 1% de cloruro de sodio. Disolver por calentamiento, distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar al autoclave a 121 °C durante 15 minutos.



- **Rojo de Metilo:** Se disuelven 0.285 gramos de polvo de medio en 15 ml de agua destilada al 1% de NaCl. Disolver por calentamiento, distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar al autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- **Voges-Proskauer:** Se disuelven 0.285 gramos de MRVP, disolver en 15 ml de agua destilada al 1% de NaCl. Disolver por calentamiento, distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar al autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- **Agar Citrato:** Se disuelven 0.36 gramos de polvo de medio en 15 ml de agua destilada al 1% de NaCl. Disolver por calentamiento, distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar al autoclave a 121 °C durante 15 minutos y dejar enfriar en cuña.

#### **4.1.8 -) Pruebas Adicionales.**

- **Agar Urea:** Se disuelven 0.36 gramos de agar urea en 14.25 ml de agua destilada al 1% de NaCl. Esterilizar 15 minutos a 121 °C enfriar a 50° C. añadir 0.4 gramos de una urea estéril en 0.75 ml de agua destilada al 1% de NaCl y mezclar. Distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar al autoclave a 121 °C durante 15 minutos y dejar enfriar en cuña.
- **Agar O/F:** Se necesitó disolver 0.846 gramos de agar O/F en 90 ml de agua destilada al 1% de NaCl para la azúcar 10 ml de agua



destilada para el 1% de NaCl, más 1 gramo de la glucosa. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121<sup>0</sup> C durante 15 minutos.

- **Carboxilasa Lysina Base Broth:** Se disolvió 9 gramos en 1 litro de agua destilada al 1% de NaCl en medio vaso se dividieron en 4 partes siendo una de ellas la de control. A los restantes se les añade los aminoácidos a estudio (ornitina, arginina) a una concentración de 0.5%: Distribuir y esterilizar en autoclave a 121<sup>0</sup> C durante 15 minutos.
- **Agar estándar:** Prueba de tolerancia de NaCl. Se necesitó preparar agar estándar en diferentes concentraciones de 0%, 3%, 6% y 8% de NaCl. Se pesó 0.365 gramos de agar estándar para disolverse en 15 ml de agua para cada concentración. Autoclavar a 121<sup>0</sup> C durante 15 minutos. Luego se distribuyó en placas petri.

#### **4.1.9 -) Antibiograma.**

**Agar Mueller Hinton:** Se disuelven 1.9 gramos en 500 ml de agua destilada al 1% de NaCl. Disolución por calentamiento. Esterilizar al autoclave a 121<sup>0</sup>C durante 15 minutos. Verter en plato petri dejando enfriar hasta que el medio se ponga sólido.

Sembrar una colonia con ayuda del asa de siembra por agotamiento y luego adicionar los discos de antibióticos y el agente vibriostático 0/129.



#### **4.1.10 -) Aislamiento y Caracterización Bacterial.**

- ❖ Con las botellas esterilizadas se recolectaron muestras de agua marina, se tomó una muestra por mes y fueron transportados adecuadamente del laboratorio de Microbiología.
- ❖ En un plato de petri con Agar T. C. B. S. Se sembró por agotamiento 0.5 ml de la muestra de agua marina. Este procedimiento se realizó por duplicado.
- ❖ Con asa de platino se sembraron unas gotas de agua marina en la superficie del Agar selectivo T. C. B. S., se utilizaron dos platos petri uno para la muestra de la superficie y una segunda placa petri para la muestra extraída cerca del sedimento, luego se incuban durante a 18 a 24 horas a 37<sup>0</sup> C.
- ❖ Pasadas las 18 horas se observó las características de las colonias que crecieron en al Agar de aislamiento selectivo T. C. B. S., tanto en las placas de muestras de la superficie como en las placas de cerca del sedimento, hallando una pigmentación de las colonias (verde y amarillas).
- ❖ Posteriormente se incubaron las colonias que nacieron en al plato petri del Agar de aislamiento selectivo T. C. B. S., al plato petri del Agar de enriquecimiento T. S. A. con ayuda del asa de siembra de una colonia característica, se rotaron las placas petri debidamente y





se incubaron a 37<sup>0</sup> C por 24 horas. Este proceso se repite para ambos tipos de colonias.

- ❖ Luego de pasadas las 24 horas se aisló una colonia de cada plato de Agar T. S. A. y se procedió a hacerle a cada colonia tinción de Gram.
  
- ❖ Se tomó una colonia de color amarillo para realizarle la tinción de Gram. A un portaobjeto se agregó una gota de agua destilada y posteriormente se tomó una colonia con el asa de siembra proveniente de la placa de enriquecimiento T. S. A. y se frota en el portaobjeto y se deja secar el frotis, luego se le aplicó al portaobjeto azul de metileno por un minuto y se lavó con agua destilada después se le aplicó lugol y se dejó por un minuto. Se procedió a la decoloración con etano por 30 segundos y se lavó con agua destilada. Se le aplicó Safranina por dos minutos y se prosiguió a lavar con agua destilada, se dejó secar y mirar al microscopio; a la placa se le agregó aceite de inmersión. Este procedimiento se le aplicó a la colonia verde.
  
- ❖ Se le realizó a los dos tipos de colonias (verde y amarilla) la prueba de la catalasa. Se depositó en un portaobjeto una gota de agua oxigenada con ayuda del asa de siembra. Se tomó una colonia verde proveniente de la placa con Agar T. S. A. y se depositó en la gota de agua oxigenada. Esta misma pruebas se les realizó a las colonias amarillas.



- ❖ Posteriormente, se le realizó la prueba de oxidasa en una placa petri limpia, se depositó un disco de papel filtro con el reactivo de la oxidasa, se tomó una colonia verde a la placa de Agar T. S. A. y se disperso por el papel con el reactivo. A la colonia amarilla se le realizó esta prueba.
  
- ❖ A cada una de las colonias provenientes de la placa de Agar T. S. A. se le realizó Prueba de Motilidad. En un portaobjeto se depositó una gota de agua destilada al 1% NaCl, posteriormente se tomó una colonia verde y se sumergió en agua destilada al 1%. Al portaobjeto se le colocó un cubreobjeto y se observó al microscopio. Esta prueba se le aplicó a la colonias de color amarillo.

#### **4.1.11 -) Pruebas bioquímicas de Bacterias Aisladas.**

- ❖ Se inóculo una colonia de color verde de la placa de enriquecimiento de Agar T. S. A. a un tubo de ensayo conteniendo agua peptonada, para luego incubarlo a 37<sup>0</sup> C por 24 horas. Esta prueba se les realizó a las colonias de color amarilla.
  
- ❖ Se inóculo una colonia de color verde de la placa de enriquecimiento de Agar T. S. A. a un tubo de ensayo conteniendo Rojo de Metilo. Posteriormente, se incubó a 37<sup>0</sup> C por 24 horas. Esta prueba se repite para las colonias de color amarillo. Posteriormente pasadas las 24 horas se reveló y se agregan: 0.6 ml (4 gotas)  $\alpha$ -naftol, luego 4 gotas de KOH al 40%, se agitó y se dejó reposar por 10 minutos.



- ❖ De la placa de enriquecimiento de Agar T. S. A. se aisló una colonia amarilla y se inóculo en estría y picadura profunda en tubo que contenía Agar Citrato en cuña. Luego se incubó a 37<sup>0</sup> C por 24 horas.
  
- ❖ Se incubó una colonia verde de la placa de enriquecimiento de Agar T. S. A. a un tubo de ensayo conteniendo urea en cuña. Se sembró en la superficie de la cuña en estría. Se incubó a 37<sup>0</sup> C por 24 horas. Este proceso se le realizó a las colonias de color amarillo.
  
- ❖ Se incubó una colonia verde de la placa petri de enriquecimiento de Agar T. S. A. a un tubo de ensayo con medio de OF y se le adicionó vaselina simple estéril. Se incubó a 37<sup>0</sup> C por 24 horas. Este mismo procedimiento se le aplicó a las colonias de color amarillo.
  
- ❖ Para la prueba de los aminoácidos se necesitaron tres tubos e ensayo conteniendo cada uno de ellos diferentes tipos de aminoácidos, el primer tubo contenía lysina y el segundo tubo contenía ornitina y un tercer tubo contenía arginina, se le inóculo una colonia verde proveniente de la placa de enriquecimiento de Agar T. S. A. a cada uno de los tubos de ensayo, luego se le aplicó a cada uno de los tubos vaselina simple y se incubó a 37<sup>0</sup> C por 24 horas.



- ❖ En las placas de T. S. A. se inóculo colonia con pigmentación amarilla a una placa de agar estándar. Se incubó a 37<sup>0</sup> C por 24 horas. Este mismo procedimiento se le aplicó a las colonias de color verde.
  
- ❖ En la prueba del antibiograma se necesitó una colonia verde de la placa de Agar de enriquecimiento de T. S. A. a una placa conteniendo Agar Mueller Hinton. Se inóculo por agotamiento la colonia verde con ayuda del asa de siembra y posteriormente se le adicionaron los discos de antibióticos y el agente vibriostático 0/129. Se incubó a 37<sup>0</sup> C por 24 horas.



## V -) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De los aislamientos selectivos realizados en Agar T. C. B. S. se obtuvieron colonias de color verde y amarillo en todas las muestras

La apariencia de las colonias y las observaciones al microscopio dio como resultado una motilidad positiva (Movimiento de las Bacterias) y una Tinción de Gram negativa fueron similares a las características del genero *Vibrio*.

La depuración de colonias de color verde y amarillo realizada en Agar T. S. A. permitió obtener colonias puras que fueron sometidas a pruebas bioquímicas.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se resumen en las tablas del 1 al 9 de Enero – Septiembre del 2003.

De Enero – Mayo se presume *Edwardsiella sp* y *Vibrio pelagius*. De Junio a Septiembre *Edwardsiella sp*, *Vibrio pelagius* y *Vibrio alginolyticus*.

*Edwardsiella sp* se reconoce por motilidad positiva y Tinción de Gram negativa, teniendo formas cocoides y una reacción oxidasa negativa por no haber presencia de un sistema citocromo oxidasa; teniendo una reacción Indol negativa porque la bacteria no produce Indol a partir del Triptofano; teniendo una reacción de Vogues-Proskauer negativa, no se observa producción de acetoína. Lysina, ornitina y arginina, estos tres últimos son aminoácidos (aa) cuya reacción es negativa porque la bacteria no puede metabolizar el



aminoácido como fuente de Carbono, lo que se observa en la falta de crecimiento. El Citrato es negativo porque la bacteria no utiliza Citrato como fuente de Carbono.

El agente vibriostático 0/129 inhibe el crecimiento bacteriano formándose un halo, cuando es positivo, confirmando que es un *Vibrio*.

*Vibrio pelagius* y *Vibrio alginolyticus* se reconoce por motilidad positiva y Tinción de Gram negativa, teniendo formas bacilos y una reacción oxidasa positiva por haber presencia de un sistema citocromo oxidasa; teniendo una reacción Indol positiva porque la bacteria produce Indol a partir del Triptofano; teniendo una reacción de Vogues-Proskauer positiva, se observa producción de acetoína, formándose la formación de un anillo de color fucsia. Lysina, ornitina y arginina, estos tres últimos son aminoácidos (aa) cuya reacción es negativa porque la bacteria no puede metabolizar el aminoácido como fuente de Carbono, lo que se observa en la falta de crecimiento. El Citrato es positivo en el *Vibrio pelagius* y negativo en el *Vibrio alginolyticus* porque cuando la bacteria no utiliza Citrato como fuente de Carbono, es negativo, y viceversa.

El agente vibriostático 0/129 inhibe el crecimiento bacteriano formándose un halo, cuando es positivo, confirmando que es un *Vibrio*.



**Tabla No. 1**  
**Identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Enero 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>
<b>Pr. Bioqx</b>		
Movilidad	+	+
Gram	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+
Indol	-	+
VP	-	+
Lysina	-	-
Ornitina	-	-
Arginina	-	-
0/129	+	+
Citrato	-	+
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>



**Tabla No. 2**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Febrero 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>
<b>Pr. Bioqx</b>		
Movilidad	+	+
Gram	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+
Indol	-	+
VP	-	+
Lysina	-	-
Ornitina	-	-
Arginina	-	-
0/129	+	+
Citrato	-	+
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>





**Tabla No. 3**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Marzo 2003**

<b>Cepa</b> <b>Pr. Bioqx</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>
Movilidad	+	+
Gram	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+
Indol	-	+
VP	-	+
Lysina	-	-
Ornitina	-	-
Arginina	-	-
0/129	+	+
Citrato	-	+
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>



**Tabla No. 4**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Abril 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>
<b>Pr. Bioqx</b>		
Movilidad	+	+
Gram	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+
Indol	-	+
VP	-	+
Lysina	-	-
Ornitina	-	-
Arginina	-	-
0/129	+	+
Citrato	-	+
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>



**Tabla No. 5**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Mayo 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>
<b>Pr. Bioqx</b>		
Movilidad	+	+
Gram	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+
Indol	-	+
VP	-	+
Lysina	-	-
Ornitina	-	-
Arginina	-	-
0/129	+	+
Citrato	-	+
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>



**Tabla No. 6**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Junio 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>	<b>Amarilla grande</b>
<b>Pr. Bioqx</b>			
Movilidad	+	+	+
Gram	-	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+	+
Indol	-	+	+
VP	-	+	+
Lysina	-	-	-
Ornitina	-	-	-
Arginina	-	-	-
0/129	+	+	+
Citrato	-	+	-
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>	<b>Vibrio alginolyticus</b>



**Tabla No. 7**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Julio 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>	<b>Amarilla grande</b>
<b>Pr. Bioqx</b>			
Movilidad	+	+	+
Gram	-	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+	+
Indol	-	+	+
VP	-	+	+
Lysina	-	-	-
Ornitina	-	-	-
Arginina	-	-	-
0/129	+	+	+
Citrato	-	+	-
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>	<b>Vibrio alginolyticus</b>



**Tabla No. 8**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Agosto 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>	<b>Amarilla grande</b>
<b>Pr. Bioqx</b>			
Movilidad	+	+	+
Gram	-	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+	+
Indol	-	+	+
VP	-	+	+
Lysina	-	-	-
Ornitina	-	-	-
Arginina	-	-	-
0/129	+	+	+
Citrato	-	+	-
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>	<b>Vibrio alginolyticus</b>



**Tabla No. 9**  
**Tabla de identificación de bacterias del Estero Las Peñitas**  
**correspondiente al mes de Septiembre 2003**

<b>Cepa</b>	<b>Verde</b>	<b>Amarilla opaca</b>	<b>Amarilla grande</b>
<b>Pr. Bioqx</b>			
Movilidad	+	+	+
Gram	-	-	-
Forma	<b>Cocos</b>	<b>Bacilos</b>	<b>Bacilos</b>
Oxidasa	-	+	+
Indol	-	+	+
VP	-	+	+
Lysina	-	-	-
Ornitina	-	-	-
Arginina	-	-	-
0/129	+	+	+
Citrato	-	+	-
Especie encontrada	<b>Edwardsiella sp</b>	<b>Vibrio pelagius</b>	<b>Vibrio alginolyticus</b>



**Tabla No. 10**  
**Tolerancia al NaCl.**

<b>% NaCl</b>	<b>V. pelagius</b>	<b>V. alginolyticus</b>	<b>Edwardsiella SP</b>
0	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(+)





## VI -) CONCLUSIÓN.

De los aislamientos realizados durante el período enero – septiembre 2003 en el Estero de Las Peñitas las bacterias del género *Vibrio* que se lograron aislar e identificar fueron:

- ❖ *Vibrios pelagius*.
- ❖ *Vibrios alginolyticus*.
- ❖ *Edwardsiella sp.*

Siendo la *sp* la predominante en estos aislamientos junto con la *Vibrios pelagius*, debido a su crecimiento en todos los aislamientos.

Todas las *sp* aisladas necesitaron de 3% a 8% de NaCl para crecer, ninguna de estas *sp* es capaz de crecer en ausencia de NaCl.



## **VII -) RECOMENDACIONES.**

- ❖ Realizar en próximos estudios una determinación cuantitativa en las muestras de aguas marinas tanto en superficie como en profundidad, durante todo el período que dure la investigación.
  
- ❖ Efectuar un estudio para determinar si las bacterias que se aíslan en el estero son iguales a las que también se aíslan en la costa.
  
- ❖ Realizar este tipo de pruebas en estanques camaroneros para determinar los diferentes tipos de *vibrios* que los afectan.



## VIII -) BIBLIOGRAFÍA.

- Vallejos RV, Leyva CV, Arocha OC. Asilamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en ostiones. Rev Cubana Hig epidemiol, 1987, 25:189-98.
- Bacterial Analytical Manual. 7 ed. DRAFT. Food and Drug Administration, Bureau of foods Division of Microbiology, Arlington: 1991.
- Kelly MT, hickman-Brenner FW, Farmer III JJ. *Vibrio*. En Ballows A, Hauster WJ, Herrman KL, Isenberg HD. Shadony HJ, eds. Manual of clinical microbiology, 5 ed Washington, DC: American Society of Microbiology, 1991, 384-95.
- Norma Cubana (NC) 38-02-07; Contaminantes Microbiológicos, Reguladores Sanitarios, 1987.
- Lehninger, Albert. “Bioquímica”, 2<sup>da</sup> Edición, Editorial Pueblo y Educación, Habana, Cuba (1981).
- Villeae, Claude A, “Biología”. 8<sup>va</sup> Edición, McGraw-Hill, México (1996).
- Madigan, Michael et. “Biología de los Microorganismos”. 8<sup>va</sup> Edición Prentice may, ENC, Madrid, España (1997).



- <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia>
  
- <http://www.aquanetsa.com./insume.html>



**IX -) ANEXOS.**

**ANEXOS**



## ANEXOS.

Agua de triptona (TW) con el 3% de Cloruro Sódico (NaCl). Composición:

Triptona .....	10 gramos.
Cloruro sódico .....	30 gramos.
Agua destilada .....	1000 mililitros.

Disolver: Ajustar el PH a 7.5, distribuir a razón de 10 ml en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave a 121<sup>0</sup> C durante 15 minutos.

Medio para comprobar la tolerancia a la sal, composición:

Peptona .....	10 gramos.
Cloruro sódico .....	80 ó 100 gramos.
Agua destilada .....	1000 mililitros.

Disolver distribuir y esterilizar a 121<sup>0</sup> C durante 15 minutos.

Agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (T. C. B. S.), composición:

Peptona de caseina .....	5 gramos.
Peptona de carne.....	5 gramos.
Extracto de levadura.....	5 gramos.
Citrato sódico .....	10 gramos.
Tiosulfato sódico .....	10 gramos.
Bilis de Buey disecada .....	5 gramos.
Cloruro sódico .....	3 gramos.
Sacarosa.....	20 gramos.
Cloruro sódico .....	10 gramos.
Citrato de hierro .....	1 gramo.
Azul de timol.....	0.04 gramos.



Azul de bromotimol .....0.04 gramos.

Agar .....14 gramos.

Agua destilada .....1000 mililitros.

Disolver los ingredientes en agua por calentamiento hasta ebullición, ajustar el PH a 8.6. Este medio no necesita autoclave. Distribuir en palto petri a razón de 15 mililitros.

Agar hierro triple azúcar (T. S. I.) al 3% de cloruro sódico, composición:

Extracto de carne .....3 gramos.

Extracto de levadura.....3 gramos.

Peptona .....20 gramos.

Cloruro sódico .....30 gramos.

Lactosa.....10 gramos.

Sacarosa.....10 gramos.

Glucosa.....1 gramo.

Citrato férrico .....0.3 gramos.

Tiosulfato sódico .....0.3 gramos.

Rojo fenol .....0.024 gramos.

Agua destilada .....1000 mililitros.

Disolver los ingredientes por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el PH a 7.4. Distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 121<sup>0</sup> C durante 15 minutos. Dejar solidificar en posición inclinada para obtener una columna en el fondo de 3 cm de altura y una sustancia inclinada de 5 cm.

### **Pruebas Confirmativas.**

Se seleccionan 3 colonias típicas crecidas sobre el Agar de aislamiento selectivo (T. C. B. S) y se subcultivan en caldo de triptona (T. W) con 3% de



cloruro sódico. Incubar de 2 a 4 horas, tiempo en el que habitualmente se observa enturbamiento:

- Medio de Tolerancia a la sal condición de: 0% de NaCl, 3% de NaCl y 6% de NaCl.
- Caldo de triptona (T. W.) con 3% de cloruro sódico para comprobar crecimiento a 42<sup>0</sup> C.
- Agar hierro triple azúcar (T. S. I.) con 3% de cloruro sódico.

**Tolerancia a la sal:** Los tubos conteniendo medio con distinta tasa de cloruro sódico en su composición se siembran e incuban a 37<sup>0</sup> C durante 18 a 20 horas. Mejor en un baño María con agitación. Aquellos tubos que muestren enturbamiento se consideran positivos.

**Caldo de Triptona (T. W.) con 3% de cloruro sódico:** El medio sembrado se incuba a 42<sup>0</sup> C durante 18 a 20 horas la reacción es positiva cuando aparece enturbamiento.

**Agar hierro triple azúcar (T. S. I.) con 3% de cloruro sódico:** Este medio, sembrado abundantemente en superficie y luego por picadura en el fondo, se incuba a 37<sup>0</sup> C durante 18 a 20 horas. En T. S. I. Se investiga la acción de V. parahaemolyticus sobre tres azúcares: lactosa, sacarosa y glucosa, así como si produce SH<sub>2</sub>. En general, las reacciones que se producen en este medio son las siguientes:

Fondo del medio amarillo	Fermentación de la glucosa.
Fondo del medio rojo	No fermentación de la glucosa.
Pendiente del medio amarillo	Fermentación de la lactosa y/o sacarosa.
Pendiente del medio rojo	No Fermentación de la lactosa ni sacarosa.





Ennegrecimiento de zona entre fondo y pendiente	SH <sub>2</sub> positiva.
No Ennegrecimiento de zona y pendiente	SH <sub>2</sub> negativa.

La reacción para *V. parahaemolyticus* en Agar T. S. I. Es la siguiente:

Fondo del medio = amarillo (Fermentación de la glucosa sin gas).

Pendiente del medio = roja, sin cambio (No fermenta ni sacarosa ni lactosa).

No hay ennegrecimiento = No produce SH<sub>2</sub>.

**Investigación del Indol:** Al cultivo obtenido sobre caldo de triptona (T. W.) con 3% de cloruro sódico se le añade 1 ml de reactivo Kovacs. En caso positivo se produce un anillos de color rojo en la superficie.

### **OXIDACIÓN Y FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA (O/F).**

Para realizar estas reacciones se utiliza el medio basal O/F, al que se le agrega 10 gramos de glucosa/litro.

#### **Medio basal O/F**

Peptona.....	2 gramos.
Extracto de levadura.....	1 gramo.
NaCl.....	5 gramos.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.2 gramos.
Azul de bromotimol .....	0.08 gramos.
Agar-agar .....	2.5 gramos.
Agua destilada .....	1000 mililitros.
PH.....	7.1

Disolver, ajustar PH y repartir en tubos. Esterilizar en autoclave a 118<sup>0</sup> C por 10 minutos.



De la colonia sospechosa inocular dos tubos simultáneamente agregando vaselina o parafina estéril a uno de ellos. Incubar a la temperatura deseada por 24-48 horas.

**Lecturas:** El viraje de color verde o amarillo implica una reacción positiva (utilización de la glucosa).

<b>Tubo</b>	<b>Cambio de color</b>	<b>Resultado</b>
Con vaselina	Sin cambio de color	Negativo (-/-)
Sin vaselina	Sin cambio de color	
Sin vaselina	Viraje a amarillo	Oxidativo (+/-)
Con vaselina	Sin cambio de color	
Sin vaselina	Viraje a amarillo	Fermentativo (+/+)
Con vaselina	Viraje a amarillo	

### **Tinción de Gram:**

- Fijar la preparación a la llama.
- Teñir con cristal violeta por dos minutos.
- Lavar con agua.
- Cubrir con lugol por un minuto.
- Lavar con agua.
- Decolorar con alcohol por treinta segundos.
- Lavar con agua.
- Cubrir con Safranina por quince minutos.
- Lavar con agua.
- Secar y mirar con aceite de inmersión.



**Bacterias Gram positivas: Azul.**

**Bacterias Gram negativa: Rojo.**

**Preparación de reactivos para tinción de GRAM.**

**Cristal Violeta.**

Cristal violeta .....2 gramos.  
Alcohol etílico .....20 mililitros.  
Oxalato de amonio .....0.8 gramos.  
Agua destilada .....80 mililitros.  
Filtrar y guardar 24 horas antes de utilizar.

**Lugol.**

Yodo resublimado .....1 gramo.  
Yoduro de potasio .....2 gramos.  
Agua destilada .....100 mililitros.

**Alcohol acetona.**

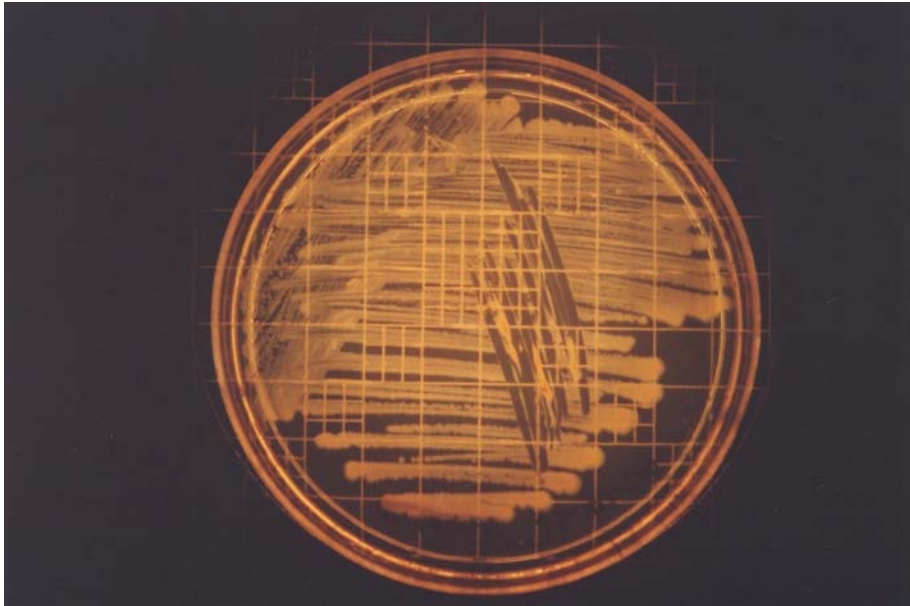
Alcohol etílico .....95 mililitros.  
Acetona.....5 mililitros.

**Safranina.**

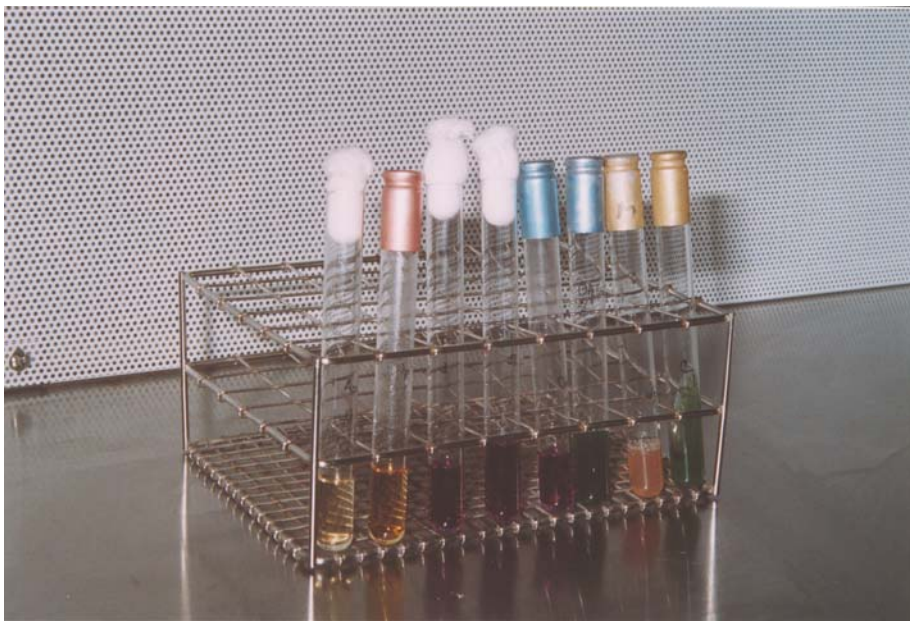
Safranina o fuesina .....0.25 gramos.  
Alcohol etílico .....10 mililitros.  
Agua destilada .....100 mililitros.  
Disolver la Safranina en alcohol y luego mezclar con agua destilada.



**PLACA INOCULADA EN AGAR T. S. A.**



**MEDIOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS SIN INOCULAR.**





**MEDIO INOCULADO DE EDWARDSIELLA**

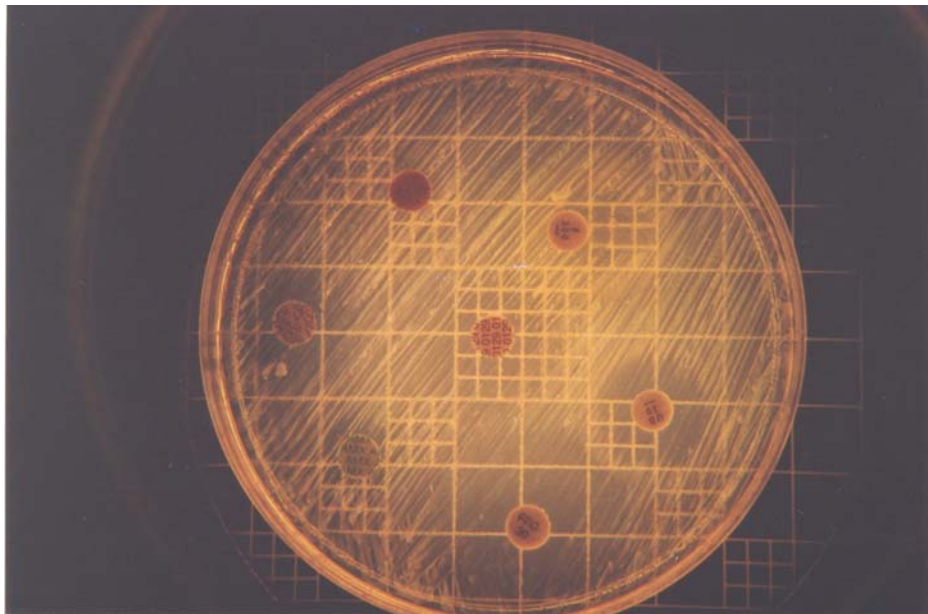


**MEDIO INOCULADO DE PELAGIUS**





## ANTIBIOGRAMA DE VIBRIO PELAGIUS



## ANTIBIOGRAMA DE EDWARDSIELLA sp

