

RESUMEN

Producto de la investigación, se encontró que existen más bacterias del género vibrios que producto del metabolismo acidifican el medio de cultivo TCBS, comprobado con el indicador azul de bromotimol y se presume que prevalecen dos especies de vibrios, las cuales corresponden a *Vibrios hollisae* y *Vibrios parahaemolyticus*.

El estudio del ritmo de crecimiento de *Vibrios sp.* se realizó con el método espectrofotométrico a una longitud de onda de 500 nm y temperatura de $27 \pm 1^{\circ} \text{C}$. Este estudio determinó que *Vibrios sp.* crece más rápido en una concentración de NaCl al 3% que en una concentración de NaCl al 3.5% y que el metabolismo realizado por la bacteria durante su crecimiento tiende a bajar el pH, en el medio de cultivo.

El pH inicial del medio de cultivo con concentración salina 3% fue de 7.95 y terminó con un pH de 7.68 para el medio de cultivo con 3.5% de Cloruro de Sodio su pH inicial fue 7.94 y su pH final fue 7.70.

El ritmo de crecimiento fue obtenido por intervalos de tiempo, en ambas concentraciones de NaCl, y como un solo intervalo por cada momento de lectura en el espectrofotómetro. A la fase exponencial presentada por *Vibrios sp.*, en ambas concentraciones de NaCl, se le determinó su constante de ritmo de crecimiento utilizando dos métodos; el primero por medio de una ecuación exponencial, la cual se hace lineal por medio de \log_{10} y el segundo por medio de un análisis de regresión lineal donde la constante de crecimiento es la pendiente de la recta.

La constante de crecimiento en la fase exponencial para 3% de NaCl es $K = 1.058$ y la pendiente de la recta es $b = 0.0056$, para 3.5% de NaCl $K = 0.928$ y su pendiente es $b = 0.0047$

INTRODUCCIÓN

La bacteriología es una ciencia de singular importancia para el desarrollo de la humanidad, ya que los microorganismos bacterianos son algunos de los responsables de las actividades que propician el reciclaje de la materia, por ende facilitar el mantenimiento de la vida en el planeta tierra.

Las diversas actividades bacterianas están reguladas directamente por la naturaleza, debido a que en dependencia de los tipos de nutrientes que se encuentran en los cuerpos de agua, así estarán presente determinados géneros y especies de bacterias, afines o consumidores de las distintas fuentes de carbono prevaecientes. Sin embargo no se puede obviar que pudiesen estar presentes en el mismo cuerpo de agua, algunas bacterias no afines a dicha fuentes carbonadas por lo que estas se encuentran inhibidas.

Además de las fuentes nutricionales como activadora o inhibidora de la actividad bacteriana, existen en la naturaleza otros parámetros que actúan como reguladores del metabolismo bacteriano. Los parámetros físicos como la temperatura y la salinidad pueden influir en gran medida en la inhibición y hasta en la muerte de determinados especies de bacterias; al igual que los parámetros químicos como los gases presentes en los cuerpos de agua y la acidez (H^+) o basicidad (OH^-)

Todas estas condiciones son las que presentan todos los cuerpos de agua, por ende es la que existe en el agua marina. En los océanos se encuentran muchos microorganismos conformadores del plancton marino, donde una de ellas, la bacterias del género *Vibrios* se encuentran en todas las épocas del año y en dependencia de los factores físicos y químicos más las fuentes nutritivas, podemos encontrar una o varias especies en determinado momento.

Las bacterias *Vibrios sp* son responsables de causar grandes mortalidades en los organismos marinos tales como peces y camarones, máxime si estos se encuentran cultivados en estanques cerrados donde el agua de este tiene muy poca comunicación con el agua oceánica.

En Nicaragua, especialmente en la región II, este ha sido un factor desestabilizador de la economía, ya que muchas granjas camaronerías han perdido casi toda su producción de camarones *Litopennaeus sp*, llevando al fracaso a una gran parte de los productores acuícolas. Muchas de estas situaciones, de alguna manera, se pudiesen evitar si tan solo los productores de camarón conocieran el hábitat adecuado donde se pueden proliferar cada una de las diferentes especies de *Vibrios*, solamente en el caso de saber diagnosticar las enfermedades es cuando se pueden adoptar las medidas de prevención y control pertinentes para cada situación. En el caso concreto de la septicemia bacteriana

de los *Litopenaeus* provocada por *Vibrios anguillarum*, por ejemplo, es posible que en un futuro no muy lejano se conozcan su ritmo de crecimiento en diversas condiciones de pH, salinidad, temperatura, nutrientes específicos para su desarrollo, flora y fauna acompañante entre otros. Lo que facilitará reducir pérdidas debido a esa importante bacteriosis en las especies de camarones objeto de cultivo.

El estudio de los agentes etiológicos no representa un gasto inútil sino, por el contrario, ha de ser considerado como una inversión, por cuanto un mejor conocimiento permite eliminar muchos de los problemas antes de presentarse los mismos en la práctica. El uso de métodos de cultivo utilizando medios específicos de crecimiento bacteriano nos permite detectar los géneros y las especies presentes en los cuerpos de aguas. Así también, el método espectrofotométrico facilita detectar el ritmo de crecimiento que experimentan los microorganismos bajo diferentes condiciones de laboratorio. En términos estrictamente prácticos, la correcta detección y diagnóstico de un determinado problema patológico no solo permite pensar en la implementación de las correspondientes medidas para su prevención y control, sino también gana valioso tiempo para el camaronicultor en el supuesto caso de que el problema no tenga solución inmediata y la única salida viable sea la de erradicar de inmediato a los ejemplares infectados y comenzar cuanto antes con la producción de una nueva población, en un ambiente determinado controlado, a fin de cumplir cabalmente con las metas de producción necesarias para asegurar la continua participación activa de la empresa en el mercado.

El camino que se abre es largo y tortuoso, motivo por el cual el éxito de la camaronicultura requerirá siempre del avance de la ciencia y la tecnología en las condiciones propias de nuestra región, para aplicar esos conocimientos en la resolución de los tantos problemas que enfrenta, en la práctica, hoy en día la camaronicultura.

Objetivo General:

- Establecer la relación de la salinidad y variación de pH con el crecimiento de las bacterias del género *Vibrios*, aisladas de las aguas marinas del sector de las Peñitas.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar las diferentes especies de *Vibrios* prevaletentes en el sector.
2. Comparar el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de *Vibrios sp.*
3. Señalar la variación del pH, del medio de cultivo, producto del metabolismo de *Vibrios sp.*
4. Determinar la constante de crecimiento de *Vibrios sp.* en dos concentraciones de Cloruro de Sodio.

I. Marco teórico

1. Requerimiento para el metabolismo bacteriano

1.1 Condición Física y Química

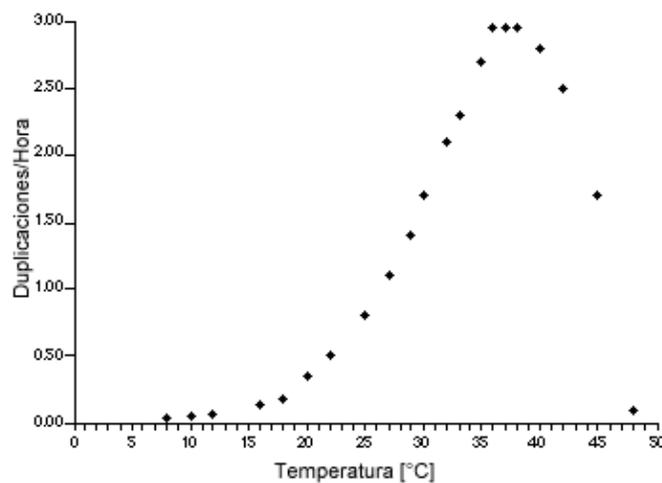
1.1.1 Temperatura

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 cuadro siguiente se presentan los rangos de temperatura en los que pueden crecer los microorganismos bacterianos

Clasificación	Rango	Optima
Termófilos	25 - 80 °C	50 - 60 °C
Mesófilos	10 - 45 °C	20 - 40 °C
Psicrófilo	-5 - 30 °C	10 - 20°C

De la misma manera el gráfico siguiente muestra el comportamiento expresado por diversos microorganismos bacterianos ante diferentes grados de temperatura.



Ritmo de crecimiento bacteriano a diferentes grados de temperatura (7).

La temperatura afecta la estabilidad de las proteínas celulares porque induce cambios conformacionales que alteran la actividad biológica de estos compuestos, especialmente la de las enzimas⁽²⁾.

1.1.2 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:

Clasificación	pH externo	pH interno
Acidófilos	1.0 - 5.0	6.5
Neutrófilos	5.5 - 8.5	7.5
Alcalófilos	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⁽²⁾.

1.1.3 Actividad de 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 (a_w) del medio representa la fracción molar de las moléculas de agua totales que están disponibles, y es igual a relación que existe entre la presión de vapor de la solución respecto a la del agua pura (p/p_0). El valor mínimo de a_w 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 $a_w = 0.80$.

Variaciones en la actividad de agua puede afectar la tasa de crecimiento, la composición celular y la actividad metabólica de la bacteria, debido a que si no disponen 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^(2, 13, 28).

1.1.4 Potencial de Oxido-Reducción

El Potencial de Oxido-Reducción es una medida de la tendencia del medio a donar o recibir electrones. Es crítico para el crecimiento de los microorganismos y generalmente está asociado con la presencia de oxígeno molecular disuelto en el medio el cual es muy oxidante. En medios que contienen oxígeno, en condiciones similares a las atmosféricas, el potencial redox varía entre 0,2 y 0,4 Voltios. Los anaerobios estrictos necesitan una atmósfera sin oxígeno 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^(2, 13, 28).

1.2 Requerimientos nutritivos.

1.2.1 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_2 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_2 como fuente de carbono y emplean fuentes de energía química proveniente generalmente de compuestos inorgánicos reducidos (H_2 , S^{2-} , NH_4^+ , 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.

1.2.2 Nitrógeno

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

- **Asimilación de 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 N_2 es reducido dentro de la célula a NH_4^{4+} y metabolizado.

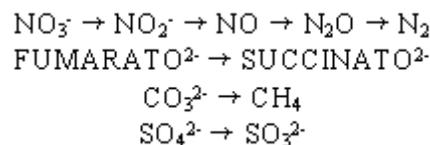
- **Reducción asimiladora de Nitratos:** los nitratos son reducidos dentro de la célula por la vía de los nitritos a NH_3 y metabolizado.
- **Hidrolizados proteicos:** los microorganismos incapaces de asimilar el nitrógeno de sales inorgánicas, lo obtienen a través de compuestos orgánicos nitrogenados 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⁽²⁾.

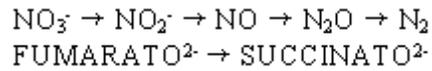
1.2.3 Oxígeno

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 un medio muy reductor. Utilizan respiración anaerobia donde los aceptores finales de electrones pueden ser generalmente SO_4^{2-} , Fumarato²⁻ o CO_3^{2-} .



- **Anaerobios facultativos:** pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Utilizan al 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 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 O_2 en la fase gaseosa). La energía la obtienen por respiración aeróbica, cuando no hay aceptores electrónicos terminales alternativos, o anaeróbica^(2, 13).

1.2.4 Azufre

El azufre puede ingresar en la célula reducido (grupos sulfhidrilos), como sulfato (debe ser reducido dentro de la célula para metabolizarse) o como aminoácidos azufrados. El azufre es utilizado para la síntesis de aminoácidos azufrados como la cisteína o metionina, que tienen un papel muy importante en la estructura terciaria de las proteínas (formación de puentes S-S) y en el sitio catalítico de enzimas⁽²⁹⁾.

1.2.5 Factores de Crecimiento

Son compuestos orgánicos que el microorganismo es incapaz de sintetizar a partir de los nutrientes y son fundamentales para la maquinaria metabólica de la célula. Son vitaminas, aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc.

En relación al requerimiento de factores de crecimiento los microorganismos se pueden dividir en:

- **Protótrofos:** microorganismos que sintetizan sus propios factores de crecimiento.

- **Auxótrofos:** microorganismos que requieren una fuente exógena de factores de crecimiento debido a que son incapaces de sintetizarlos.

1.2.6 Iones Inorgánicos

Son esenciales para el crecimiento porque estabilizan los compuestos biológicos como enzimas, ribosomas, membranas, etc. Los iones requeridos para el crecimiento bacteriano son aportados en el medio a través de sales que contienen K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , PO_4^{3-} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y trazas de Cu^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} . (13, 28, 29)

2. ESTRUCTURAS CELULARES.

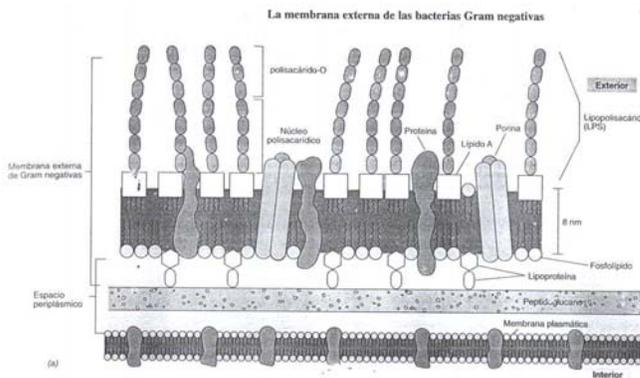


Fig. 1 Estructura externa de la pared celular de las bacterias gram negativas. (37)

2.1 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 (37)

La capa rígida de las bacterias gram negativa y gram positiva es muy similar en su composición química. Ésta 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 y 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 negativa 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. ^(13, 37)

En las bacterias gram negativa solo 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 negativa 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. ^(29, 37)

2.2 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 dispersan 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 hidrofobas 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 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.^(29, 37)

2.3 Membrana plasmática como barrera de permeabilidad

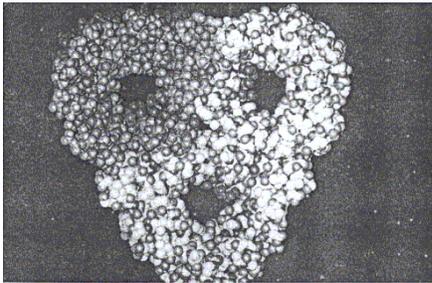


Fig. 2 Esquema estructural de las proteínas transmembranales porinas formando agujeros de 1 nm de diámetro(37).

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 esta abierto, el agua y muchas moléculas no cargadas, disueltas en el agua, pueden pasar a través, mientras que cuando el poro esta cerrado la penetración de los materiales solubles en el agua es imposible^(29, 37).

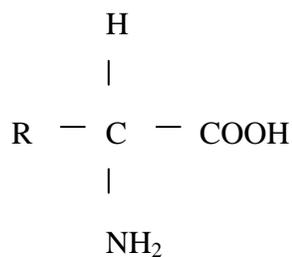
Para las moléculas ionizadas tales como los ácidos orgánicos, los aminoácidos y las sales inorgánicas existe otra barrera a la penetración, debido a que las moléculas ionizadas son repelidas por la carga eléctrica sobre la superficie de la membrana. Por otro lado, las sustancias solubles en grasa tales como los hidrocarbónos y los ácidos grasos no cargados penetran rápidamente en las células al ser disueltos en la fase lípida de la membrana.⁽²⁹⁾

3. *Bioquímica microbiana*

3.1 Aminoácidos

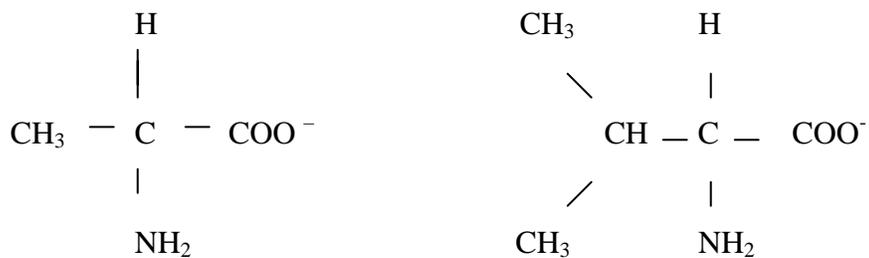
Estos constituyen el alfabeto de la estructura proteica y determinan muchas de las propiedades importantes de las proteínas. Además de los 20 aminoácidos hallados como sillares de las proteínas, otros muchos aminoácidos presentes biológicamente desempeñan otras funciones en las células^(13, 29)

La forma estructural general de los 20 α - 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 mas significativo es el que se fundamenta en la polaridad de sus grupos R

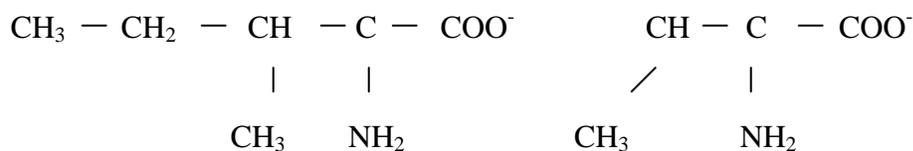
3.1.1 Aminoácidos con grupo R no polares: esta familia contiene cinco aminoácidos con grupos R que son hidrocarburos alifáticos, dos con anillos aromáticos y uno con azufre.



Alanina

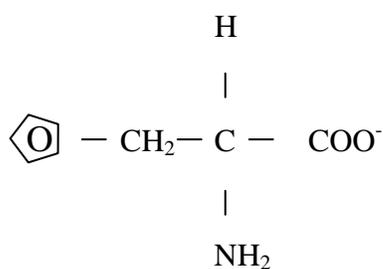
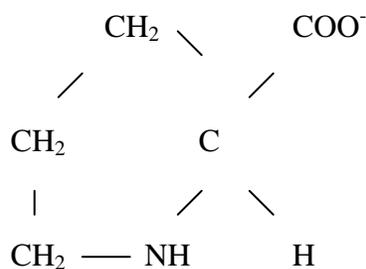
Leucina





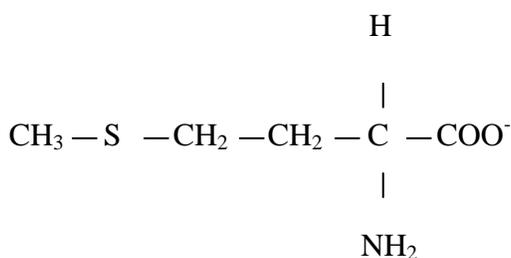
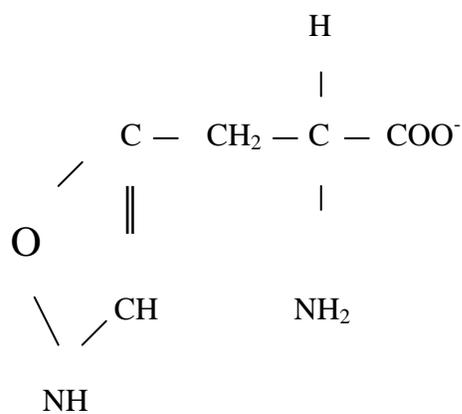
Isoleucina

Valina



Prolina

Fenilalanina



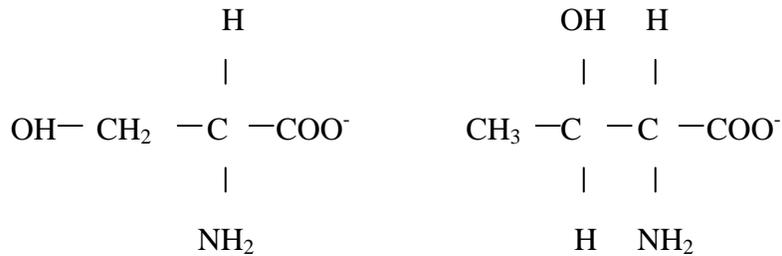
Triptofano.

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.⁽²⁹⁾

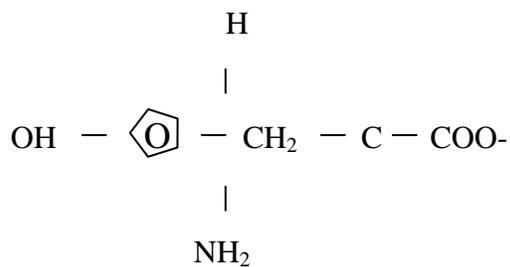
3.1.2 Aminoácidos con grupos R polares sin carga:

Estos son relativamente mas 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 hidrógenos con el agua, y esta familia consta de siete aminoácidos.



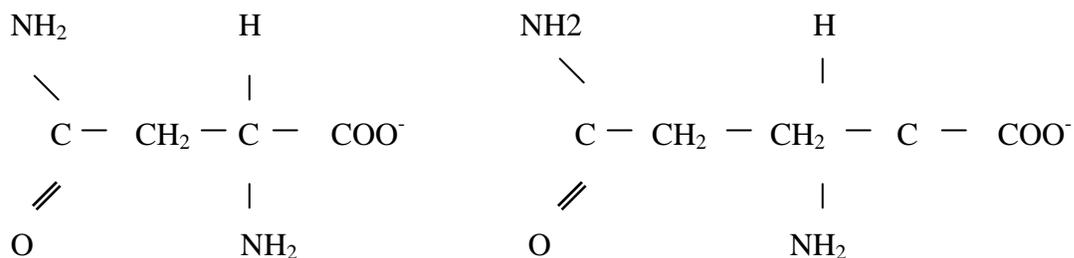
Serina

Treonina



Tirosina

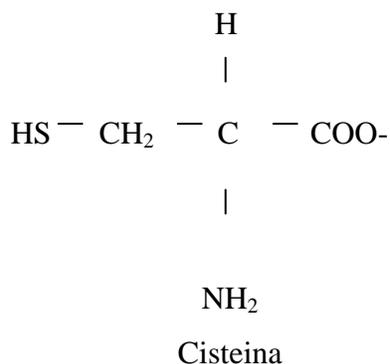
La polaridad de estos aminoácidos se debe a sus grupos hidroxilo.



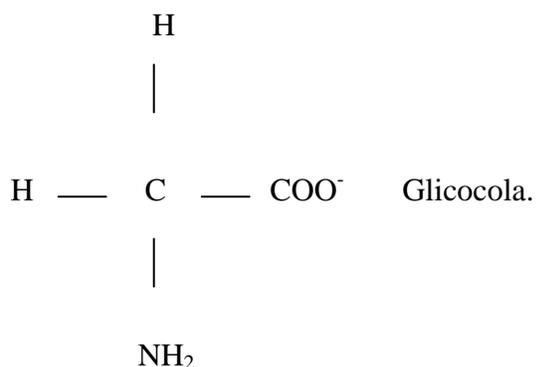
Asparagina

Glutamina

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



La polaridad se debe a su grupo sulfidrilo.

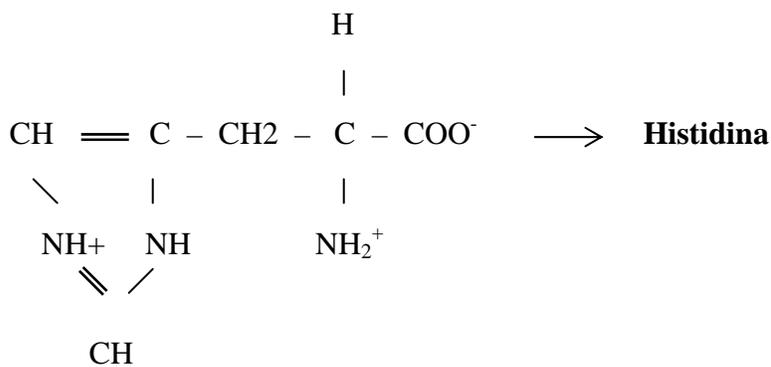
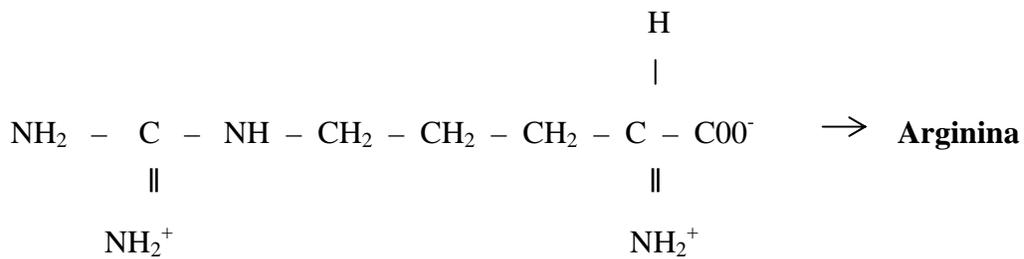
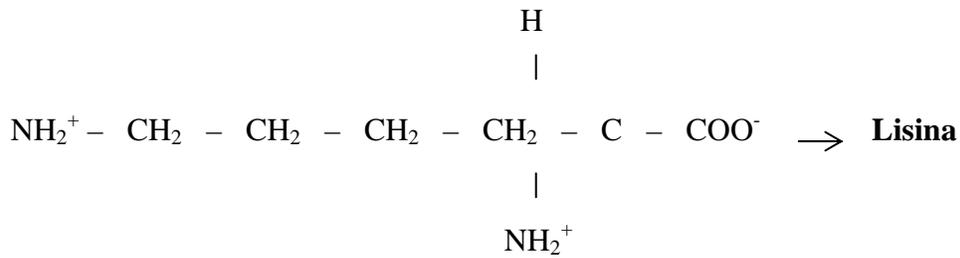


Este aminoácido es el término fronterizo de este grupo, se clasifica a veces como un aminoácido no polar pero su grupo R, que es un átomo de hidrógeno, es demasiado pequeño para que pueda influir en la elevada polaridad de los grupos α - amino y α - carboxilo⁽²⁹⁾.

3.1.3 Aminoácido con grupos R cargados positivamente.

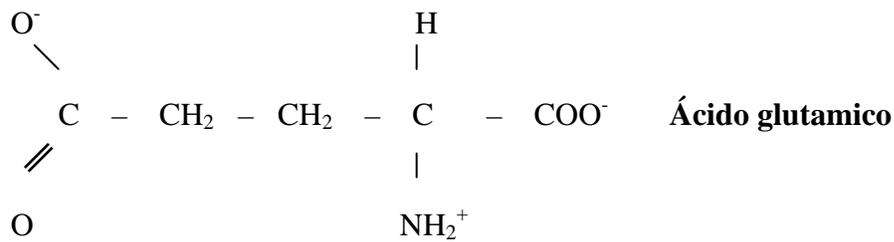
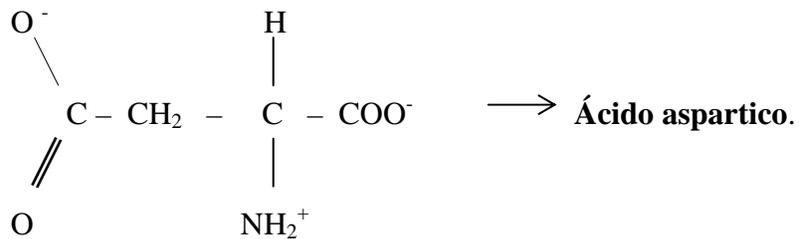
Los aminoácidos básicos en los que los grupos R poseen carga positiva neta a pH 7 poseen todos seis átomos de carbono. Están constituidos por la lisina, que contiene un segundo grupo amino en δ de la cadena alifática. La arginina que tiene un grupo guanidinio cargado positivamente y la histidina que contiene la función imidazolio, débilmente básica. La histidina posee propiedades límites, a pH 6 mas 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⁽²⁹⁾.



3.1.4 Aminoácidos con grupos R cargados negativamente.

Los dos miembros de esta clase son los ácidos aspártico 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. ⁽²⁹⁾



3.1.5 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:

Trasnsaminación: Es la manera mas simple y probablemente la mas común en los microorganismos; aquí el grupo amino es cambiado por el grupo ceto de un cetoacido 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. ^(13, 28, 29, 37)

Los aminoácidos pueden también ser utilizados después de una descarboxilación en la cual el grupo carboxilo es convertido en CO₂ 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 ⁽³⁷⁾

3.2 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. ⁽²⁹⁾

Composición Química: 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 ⁽²⁹⁾

En las moléculas proteicas los sucesivos restos aminoácidos se halla 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 un aminoácido y del grupo α – amino del siguiente. Estas macromoléculas, que reciben el nombre de polipéptidos, pueden contener centenares de unidades de aminoácidos ⁽²⁹⁾

3.2.1 División de las proteínas:

Simples: Son las que por hidrólisis produce solamente aminoácidos y contiene habitualmente 50 % de carbono, 7 % de hidrógeno, 23 % de oxígeno, 16 % de Nitrógeno y de 0 a 3 % de azufre.

Conjugadas: Son las que por hidrólisis producen no solamente aminoácidos, sino también otros componentes orgánicos o inorgánicos al que se le denomina grupo prostético.

Ésta naturaleza química, les permite obtener la clasificación de nucleoproteínas y lipoproteínas, las cuales contienen ácidos nucleicos y lípidos, respectivamente, así como fosfoproteínas, metaloproteínas y glucoproteína ⁽²⁹⁾

3.2.2 Clasificación de las proteínas:

Fibrosas: Constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas de modo paralelo a lo largo de una eje, formando fibras o láminas largas. Son materiales físicamente resistentes, insolubles en el agua o en las disoluciones salinas diluidas.

Globulares: Constituida por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente, de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. La mayor parte de las proteínas globulares son solubles en los sistemas acuosos. Generalmente desempeñan una función móvil o dinámica en las células. De los casi dos millares de enzimas diferentes conocidas hasta ahora casi todos son proteínas globulares, como también lo son los anticuerpos, algunas hormonas y muchas proteínas que desempeñan función de transporte ⁽²⁹⁾

3.2.3 Efecto de pH sobre la actividad enzimática.

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima. Por encima o por debajo de ese pH, la actividad disminuye.

La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido – base de la enzima y del sustrato. ^(2, 37)

3.2.4 Efecto de la temperatura sobre la reacciones enzimática.

Al igual que ocurre con la mayoría de reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, se incrementa en general con la temperatura dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activo. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica aproximadamente por cada 10° C de aumento de temperatura. Sin embargo, el coeficiente de temperatura química, varía algo de una enzima a otra según la energía de activación de la reacción catalizada.

3.2.5 Estructura de las proteínas:

Los términos específicos empleados correctamente para designar los diferentes aspectos o niveles de la estructura de las proteínas son:

Primaria. Se refiere al esqueleto covalente de la cadena polipeptídica y establece de modo específico la secuencia de sus restos aminoácidos.

Secundarias. Ordenación regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas a lo largo de una dirección. La estructura secundaria es sobre todo evidente en las proteínas fibrosas, en las que las cadenas polipeptídicas poseen una conformación expandida o enrollada longitudinalmente lo mismo ocurre en segmentos de cadena polipeptídicos globulares.

Terciaria. Se refiere al modo como la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar la estructura estrechamente plegada y compacta de las proteínas globulares.

Cuaternaria. Pone de manifiesto como se disponen en el espacio las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena. La mayor parte de las grandes

proteínas, ya sean fibrosas o globulares, contiene dos o más cadenas polipeptídicas, entre las cuales pueden no existir enlaces covalentes⁽²⁹⁾

3.2.6 Desnaturalización de las proteínas.

Muchas moléculas proteicas solo retienen su actividad biológica dentro de una fluctuación muy limitada de temperatura y de pH. La exposición de proteínas solubles o globulares a pH extremos o a temperaturas elevadas, les hace experimentar un cambio conocido como desnaturalización, el efecto más visible del cual, consiste en un descenso de su solubilidad. Puesto que los enlaces químicos covalentes del esqueleto peptídico de las proteínas no se rompen durante este tratamiento relativamente suave, se ha llegado a la conclusión que la estructura primaria permanece intacta. La mayor parte de las proteínas globulares experimentan el proceso de desnaturalización cuando se calientan por encima de 60 – 70 °C^(2, 13, 29)

La desnaturalización consiste en el desplegamiento de la estructura nativa plegada, característica de la cadena polipeptídica de la molécula de las proteínas globulares. Cuando la agitación térmica provoca que la estructura nativa plegada se desarrolle o se distienda, originando una cadena libre ondulada, la proteína pierde su actividad biológica.

Se han observado muchos casos en que la molécula desplegada recupera su forma nativa en tubos de ensayo, en un proceso que recibe el nombre de renaturalización⁽²⁹⁾.

3.2.7 Diversidad funcional de las proteínas.

Proteínas enzimáticas.

Las enzimas representan la clase más amplia. Se conocen cerca de dos millones de enzimas diferentes, cada una de las cuales cataliza un tipo diferente de reacción química. Son extraordinariamente específicos en su función. El enzima Hexoquinasa, cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde el trifosfato de adenosina (ATP) a la glucosa, siendo la primera etapa del metabolismo de la glucosa. Otras enzimas deshidrogenan moléculas de combustible. Otras como el citocromo C transfieren electrones hacia el oxígeno molecular

durante la respiración o bien como la DNA polimerasa y los enzimas activadores de aminoácidos participan en la biosíntesis de los compuestos celulares, cada tipo de moléculas de enzima tienen un centro activo al que se une su sustrato específico durante el ciclo catalítico⁽²⁹⁾

Almacenamiento: Almacenan aminoácidos como elementos nutritivos y como sillares para los embriones en crecimiento.

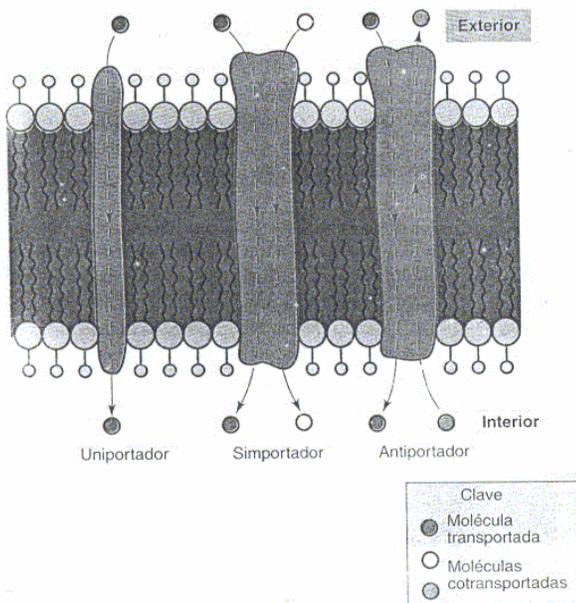


Fig. 2. Esquema gráfico que muestra el mecanismo operativo de los distintos tipos de proteínas de transporte.⁽³⁷⁾

Transporte: Algunas proteínas son capaces de unirse y transportar tipos específicos de moléculas. La seroalbumina se une estrechamente a los ácidos grasos libres transportando moléculas entre el tejido adiposo. Las lipoproteínas transportan lípidos, la hemoglobina de los eritrocitos de los vertebrados transportan oxígeno desde los pulmones a los tejidos. En los invertebrados, como en el género *litopennaeus* la hemociana es la encargada del transporte del oxígeno a todos los tejidos del cuerpo.

Defensivas: Proteína sanguínea como la trombina y el fibrinógeno que participan en la coagulación de la sangre e impiden de este modo la pérdida de sangre del sistema vascular de los vertebrados. Igual caso es el que persiste en la coagulación de la hemolinfa en los camarones, gracias a la presencia de una enzima fibrinogena que coagula la hemolinfa de los camarones en un tiempo promedio de 5 segundos.

Anticuerpos: se combina con las proteínas extrañas o con otros cuerpos que se han introducidos para neutralizarlos.

Toxinas: Son sustancias extremadamente tóxicas para los animales en cantidades muy pequeñas como la toxina de la bacteria anaerobia *Clostridium botulinum*⁽²⁹⁾

Hormonas: Entre las proteínas mas interesantes se hallan aquellas que actúan como hormonas, tales como la hormona del crecimiento o somatropina, la insulina segregada por ciertas células especializadas para regular el metabolismo de la glucosa entre otros ⁽³⁸⁾

Estructurales: En los vertebrados la proteína fibrosa colágeno es la principal proteína estructural extracelular en el tejido conectivo y el hueso. En las bacterias el peptidoglucano es el principal componente estructural de la pared celular la cual le confiere la rigidez a la pared celular y le da forma a las bacterias. ⁽¹³⁾

3.3 Solubilidad de las proteínas globulares.

Las proteínas en disolución muestran cambios profundos de su solubilidad en función de 1) pH 2) Fuerza iónica 3) Las propiedades directivas del disolvente y 4) La temperatura. Estas variables son reflejo del hecho de que las proteínas son electrolitos de peso molecular muy grande ya que cada proteína posee una composición en aminoácidos la cual determina su comportamiento como electrolitos.

3.3.1 Precipitación isoelectrica: La solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares se halla profundamente influida por el pH del sistema. ejemplo: la solubilidad de la β – lactoglobulina, una proteína de la leche, es mínima cuando el pH se encuentra entre 5.2 y 5.3 independientemente de la concentración de cloruro sódico presente. Casi todas las proteínas globulares muestran un mínimo de solubilidad, aunque el pH al que ello ocurre varía de una proteína a otra.

El pH al que una proteína muestra un mínimo de solubilidad es su punto isoelectrico definido como aquel valor del pH al que la molécula no posee carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un cuerpo eléctrico. En estas condiciones no existe repulsión electrostática entre molécula de proteínas vecinas y tiende a coalescer y precipitar.

La proteína isoelectrica precipitada permanece en su conformación nativa, y puede reducirse en un medio de pH apropiado y concentración salina adecuada. Para una proteína determinada el pH isoelectrico variará algo según la composición iónica del medio, puesto que las proteínas pueden unirse a ciertos aniones o cationes. ⁽²⁹⁾

3.3.2 Efecto de la salinidad en la solubilidad de las proteínas.

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A baja concentración las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilidad por salado. Las sales de los iones divalentes como el $MgCl_2$ y $(NH_4)SO_4$ son muchos mas eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el $NaCl$, el $NH_4 Cl$ y el KCl .

El efecto de la solubilidad por salado esta causado por cambios de la tendencia a la ionización, de los grupos R dissociables de la proteína.

Por otra parte, a medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir. Uno de los factores que concurren en ella es que la concentración elevada de la sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína, reduciendo, por tanto, su solubilidad. Las proteínas precipitadas por salado retienen su

conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, normalmente sin experimentar desnaturalización.⁽²⁹⁾

3.3.3 Efecto de la temperatura sobre la solubilidad de las proteínas:

Dentro de una fluctuación limitada entre 0 y 40° C aproximadamente, la mayor parte de la solubilidad de las proteínas globulares aumenta al elevar la temperatura, aunque existen algunas excepciones, como ocurre con los electrolitos sencillos. Por encima de los 40 y 50°C la mayor parte de las proteínas aumentan en inestabilidad y comienzan a desnaturalizarse generalmente con pérdida de solubilidad en la zona neutra de pH, algunas proteínas son mas estables y su solubilidad es máxima a temperatura ambiente o a la temperatura de su entorno celular normal⁽²⁹⁾.

4. Crecimiento microbiano.

Es útil distinguir entre el crecimiento de las células individuales y el de las poblaciones de células. El crecimiento de una célula lleva a un aumento de su peso y tamaño y generalmente es un prelude de la división celular. El crecimiento de una población, por otra parte, conduce a un incremento en el número de células como consecuencia del crecimiento y divisiones celulares.

4.1 Crecimiento de la población: generalmente tiene lugar a un ritmo exponencial. El crecimiento exponencial es consecuencia del hecho de que cuando una célula se divide cada célula hija se divide a su vez produciendo dos nuevas células, de modo que en cada periodo divisional la población se duplica. Si se representa en un gráfico asimétrico el número de células en función del tiempo, la línea obtenida se curva hacia arriba a un ritmo que se incrementa progresivamente, mientras que cuando se representa el logaritmo del número de células en función del tiempo, resulta una línea recta.

La velocidad del crecimiento exponencial se expresa generalmente como tiempo de generación, o tiempo de duplicación, que es el tiempo que tarda la población en duplicarse.

Alternativamente, el ritmo de crecimiento puede expresarse también como el número de duplicaciones por hora.

Una de las características del crecimiento exponencial es que la velocidad de incremento del número de células es inicialmente lenta, pero aumenta a un ritmo cada vez más rápido, esto determina en etapas posteriores, un incremento explosivo al número de células^(13, 37).

4.2 Las matemáticas del crecimiento.

Aunque muchos análisis de crecimiento microbiano se pueden hacer perfectamente bien por el método gráfico, para algunos fines es conveniente utilizar una ecuación que exprese las relaciones cuantitativas.

Puesto que la constante del ritmo de crecimiento, k , se da en duplicaciones por hora, el tiempo requerido para que la población se duplique, es la inversa $1/k$. El cálculo de tiempo de generación para una población en crecimiento exponencial proporciona una ventaja al utilizar esta ecuación ya que permite estimaciones rápidas de tiempo de duplicación cuando deben analizarse muchos experimentos separados; el método gráfico sería mucho más lento⁽¹³⁾.

Ecuación:

$$X_t = 2^{kt} x_0$$

Tomamos el logaritmo en base 2

$$\text{Log}_2 \frac{x_t}{x_0} = kt$$

$$K = \frac{\log_2 x_t - \log_2 x_0}{t}$$

Convertimos a logaritmo en base 10

$$K = \frac{\log_{10} x_t - \log_{10} x_o}{(0.301)t}$$

X_o = número de células en el tiempo inicial.

X_t = Número de células en un tiempo posterior t ,

t = Longitud del tiempo donde X_o a X_t expresada en horas o minutos.

K = Constante de ritmo de crecimiento expresada como número de duplicaciones por unidad de tiempo.

$1/K$ = Tiempo de generación, el tiempo requerido para que la población se duplique.

4.3 Medida de la masa microbiana.

Una suspensión celular parece turbia porque cada célula dispersa la luz; cuantas mas células haya, mas luz de dispersará. Las medidas de turbidez son extensamente utilizadas en los estudios del crecimiento microbiano porque son simples, directas y no destruyen las células. El instrumento mas ampliamente utilizado para cuantificar la turbidez es el absorciometro, que mide el grado en el cual la suspensión reduce la transmisión de la luz. Los absorciometros comerciales se denominan colorímetros o espectrofotómetros porque también se utilizan para medir la absorción de la luz por parte de las soluciones coloradas. La lectura obtenida es o bien un porcentaje de transmisión o bien una densidad óptica, siendo esta última una función logarítmica del porcentaje de transmisión.

Absorbancia: $2 - \log_{10} x$, en que x es porcentaje de transmisión. Así, para 100 por ciento de transmisión ($\log_{10} 100 = 2$) lo que da absorbancia = 0 y la absorbancia va de 0 hasta α

Esta transformación en logaritmo es útil porque la masa celular es directamente proporcional a la absorbancia de forma que un gráfico de absorbancia en función del tiempo de una simple curva aritmética de crecimiento. Para un cultivo con crecimiento exponencial el logaritmo de la absorbancia representado gráficamente en función del tiempo dará una línea recta.

La relación esta en la masa microbiana y la densidad óptica es lineal a densidades ópticas bajas, pero se desvía a valores altos. Para medir la turbidez de suspensiones muy densas es poco necesario diluirlas hasta que su densidad óptica sea lineal. Para cada organismo que se va a estudiar es siempre aconsejable prepara una curva estándar que relacione la masa celular con la absorbancia y determinar así los valores en los que existe linealidad. ⁽³⁷⁾

La turbidez de una suspensión celular está mas íntimamente relacionada con el peso celular que con el número de células, y, por ello, proporciona un medio rápido para estimar el aumento de masa celular en los cultivos. Para relacionar la turbidez con la masa celular debe construirse primero una curva de calibración para el organismo en cuestión puesto que los diferentes organismo dispersan la luz en grados diferentes⁽³⁷⁾.

4.4 Métodos espectrofotométricos.

Uno de los métodos físicoquímico más empleados en análisis es el de la medida de la absorción o emisión de la energía radiante. La gran difusión de ésta técnica es consecuencia de los factores siguiente:

- El amplio intervalo de longitudes de onda o de frecuencia de energía radiante y sus diferentes modos de interacción con la materia.
- La existencia en el mercado de instrumentos de medida cada vez más precisos.
- Las ventajas inherentes al método: Generalmente, el análisis es muy rápido una vez que se ha establecido el método, a no ser que se requiera un tratamiento previo para eliminar interferencias. El método es por tanto, muy cómodo para medidas repetidas de un mismo constituyente.

Además, el método es en general, aplicable a la determinación exacta de cantidades de constituyentes mucho menores comparados con los métodos gravimétricos o volumétricos, es por tanto, muy adecuado para el análisis de trazas.

Los métodos espectrofotométricos tienen la importancia, que son los más utilizados en casi todos los laboratorios industriales, clínicos, de investigación o de enseñanza⁽⁹⁾.

4.5 Leyes de la espectrofotometría

Cuando un haz de luz de energía monocromática incide sobre una capa homogénea de una sustancia transparente o coloreada, parte de la energía es absorbida y el resto transmitida. (En realidad, también una pequeña parte es reflejada, por lo que cuando se diseña un aparato para hacer estas medidas se tiene en cuenta este factor, de tal forma que se elimine su influencia). Si la energía radiante incidente tiene longitudes

de onda en la región visible del espectro y el medio a través del cual tiene que pasar, absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda, el color observado corresponderá a las longitudes de onda de la energía transmitida.

4.6 Ley de Beer.

La Ley de Beer establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes.

$A = \epsilon bc$, esta ecuación, fundamental para aplicar la espectrofotometría en química se denomina ley de Beer.

En donde:

A = es la absorbancia.

b = longitud del trayecto óptico.

c = la concentración de la muestra.

ϵ = Coeficiente de absorptividad

Absorbancia, (A), es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia(T), en el que el disolvente puro es el material de referencia, esto es, $A = \text{Log}_{10} 1/T = -\log_{10} T$ ^(9, 10)

4.7 Desviaciones de la ley de Beer

Normalmente se emplea como comprobante, de conformidad con la ley de Beer ó como prueba de la desviación, una gráfica de A en función de la concentración, que sirve también como curva de calibración para el análisis de disoluciones.

La mayor parte de esas desviaciones son más aparentes que reales y son debidas a una de las siguientes causas:

- Carencia de monocromatismo de la luz incidentes. Aparecen con frecuencia desviaciones aparentes de la absorbancia cuando se mide con un fotómetro de filtro, en el que la radiación incidente está incluida en una banda amplia de longitudes de

onda, sobre todo si el centro de la banda no coincide con la longitud de onda para la que se mide el sistema con máximo de absorción.

- Cambios químicos en el sistema, de tal forma que las especies absorbentes no representan la totalidad de la concentración.

Los cambios más frecuentes son la asociación, disociación, interacción con el disolvente (por ejemplo, hidrólisis), efectos de pH, etc. Las desviaciones reales de la Ley de Beer son insignificantes a concentraciones menores de 0.01 M, pero pueden aumentar porque el término constante en la ley no es la absorptividad, sino una función de la absorptividad y del índice de refracción. También a altas concentraciones, las partículas de soluto quedan tan juntas que se altera su distribución de carga y la capacidad para absorber radiaciones de una determinada longitud de ondas.

5. *Microbiologías de Aguas.*

Las bacterias planctónicas son principalmente gram negativos (80% a 95%) y a menudo son móviles, pleomorfas y pigmentadas. Muchas bacterias, particularmente en océanos con bajo contenido de nutrientes y lagos oligotróficos, son muy pequeñas, con frecuencia menos de 0.5 μm 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⁽³⁹⁾

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 la reciclación 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 solo unos minutos en condiciones

óptimas. Una vez que la materia se ha hundido por debajo de la termoclina, debe esperar a que se rompa la estratificación antes de que se pueda usar de nuevo por la mayor parte del fitoplancton, de modo que la cantidad de materia reciclada en la zona fótica es de gran importancia para la productividad de las algas⁽³⁹⁾.

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⁻¹ a varios miles por ml⁻¹ 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 anóxicos. Estas bacterias anaerobias producen metano y compuesto de azufre reducido los quimiolitotrofos puede ser también importantes en hipolimnios anóxicos.

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 anóxicas 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⁽³⁹⁾.

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 plancton⁽³⁹⁾.

5.1 Bacterias del género *vibrios* y afines

El grupo *Vibrios sp* está colocado junto a las bacterias entéricas, su morfología es bacilar o bacilar curva, aeróbicos facultativos, gran negativos que poseen un metabolismo de fermentación. La mayor parte de los miembros del grupo *Vibrios* tiene flagelación polar, aunque algunos miembros están flagelados peritricamente. 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⁽³⁶⁾.

Estos microorganismos 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. Tienen afinidad por la sal, es decir son halófilas ya que requieren por lo menos 2 % 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*, *alginolitycus*, *anguillarum* y *algaesus*.. 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 sistémicas las mortalidades son del 100 % a las 24 horas de aparecida la infección^(3, 27, 36).

5.2 Pruebas bioquímicas para caracterización de *Vibrios*

5.2.1 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:

5.2.2 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 de pH 5.1 y rojo por debajo de 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 término de los cuales la reacción del rojo de metilo es ya negativa ⁽³⁴⁾.

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.⁽³⁴⁾

Prueba Voges – Proskauer en *Vibrios*, en medio de cultivo, Medio Fluido Ref. 3-375. Para la lectura se mezclan 2 partes de la solución de alfa –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)

5.2.3 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 rojo 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 mas estable si en lugar del alcohol amílico se utilizaba butílico o isoamilico ⁽³⁴⁾

5.2.4 Tinción de Gram.

Las células fijadas al calor sobre un portaobjeto 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 este 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 (KI). 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 grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación. Se lleva a cabo después de la decoloración, usando bien alcohol o bien cetona, sustancias en las que es soluble el complejo I_2 – cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran, mientras que otros (Gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células esta por tanto en su resistencia a la decoloración. Después de la decoloración las células grampositivas son todavía azules, pero las gramnegativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la decoloración de contraste las células gramnegativas son rojas, mientras que las grampositivas 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 solo tiene poca afinidad con las células.
- 2- La decoloración debe realizarse con poca agua para evitar que pierdan la tinción las células grampositivas. El proceso de decoloración debe ser corto y es esencial un cálculo preciso del tiempo para obtener resultados satisfactorios. Finalmente, el carácter de grampositivo no es siempre un fenómeno del todo o nada. Algunos organismos son mas

grampositivos que otros y algunos son variables, es decir, unas veces grampositivos y otras gramnegativos.

Fundamento de la tinción de Gram: Notese 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 gramnegativas pero no de las grampositivas. Las bacterias grampositivas 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 grampositivas. Por tanto, no son los constituyentes químicos, sino la estructura física de la pared lo que le confiere la grampositividad ⁽³⁴⁾.

5.2.5 Prueba de Oxidasa

La prueba de oxidasa está 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 (24).

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 sus 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 eran

aeróbicos, o anaeróbicos facultativos, excepto el *Vibrio fetus*, que tiene un requerimiento de oxígeno microaerofílico. Gordon 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 ^(24, 25, 29)

6. *Aislamiento y depuración de crecimiento bacteriano.*

6.1 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 necesarios.

- **Medio sintético:** son los medios que contienen una composición química definida cuali 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 establecida. Son mezclas 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).

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 incuba bajo determinadas condiciones.

Aquellos microorganismos para los que el ambiente sea más favorable crecerán más que los otros y finalmente serán predominantes⁽²⁾.

6.1.1 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 alimento sospechosos de portadores de los mismos. Actualmente esta 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 parahaemeolyticus*. También crecen en este medio de cultivo *V. alginolitycus* 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.

6.1.2 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 ellos 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 visible al ojo humano.

6.1.3 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 ello se inocula la cepa a ensayar en dos tubos lagos y estrechos (12 x 120) mediante picadura profunda y uno de ello 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 solo producen esta reacción en el tubo sin vaselina, sin cambio apenas o a veces sin crecimiento en el tubo cerrado.

Los inactivos son aquellos que no utilizan los azúcares y que no provocan cambios en los tubos o tan solo un ligero azulamiento en el abierto, probablemente por la alcalinización de vida a la degradación de la peptona⁽³⁴⁾.

7. Ciclo de crecimiento de las poblaciones.

Una curva típica de crecimiento de una población de células puede dividirse en varias fases distintas denominadas Fase de Latencia, Fase Exponencial, Fase Estacionaria y Fase de Muerte.

Fase de Latencia: Si se inocula una población microbiana en un medio fresco, generalmente el crecimiento no empieza de inmediato, sino después de cierto periodo de tiempo, que puede ser breve o dilatado, según las condiciones. Esto se debe a que las células se encuentran en general desprovistas de diversos coenzimas esenciales y otros constituyentes celulares y se necesita tiempo para sintetizarlos de nuevo. También sobreviene latencia cuando el inóculo está compuesto por células que han sido dañadas (pero no destruida) por tratamiento con calor, radiaciones o sustancias tóxicas^(13, 37).

Se observa también latencia cuando se transfiere una población de un medio de cultivo rico a otro más pobre. Esto sucede porque para que haya crecimiento en un medio de cultivo particular, las células deben tener una dotación completa de enzimas para la síntesis de los metabolitos esenciales no presentes en el medio. Al transferirlos a uno nuevo se requiere un cierto tiempo para la síntesis de nuevas enzimas ⁽¹³⁾

Fase exponencial: Es cuando la célula presenta condiciones óptimas en el medio para su desarrollo, por lo que, el ritmo de crecimiento se da en el tiempo mínimo requerido para que cada célula de la población se divida en dos.

Fase estacionaria: En un recipiente de cultivo una población no puede crecer indefinidamente a ritmo exponencial. La limitación del crecimiento se produce o bien porque se agota el suministro de un nutriente esencial o bien porque se acumula algún metabolito tóxico.

Fase de muerte: Después que una población llega a la fase estacionaria, las células pueden permanecer vivas y continuar metabolizando, pero a menudo mueren. Durante esta fase de muerte el conteo microscópico directo puede permanecer constante, pero el conteo viable decrece lentamente. En algunos casos la muerte va acompañada por lisis celular que conduce a un descenso en el conteo microscópico directo, juntamente con un descenso en el conteo de viables.

Pruebas recomendadas para clasificación de bacterias del género *Vibrios* ⁽²⁴⁾

Especies	Salinidades %					Utilización de Azúcares en las fases O/F	Oxidasa	Ureasa	Voges Proskauer
	0	3	6	8	10				
<i>V. anguillarum</i>	-	+	+	-	-	S ⁺ L ⁻ M ⁺	+	-	+
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	+	-	-	S ⁺ L ⁻ M ⁻	+	-	+
<i>V. damsela</i>	-	+	V	-	-	S ⁻ L ⁻ M ⁻	+	-	+

<i>V. Parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	S ⁻ L ⁻ M ^V	+	-	-
<i>V. Carchariae</i>	-	+	+	+	-	S ⁺ L ⁻ M ⁺	+	-	-
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+	V	-	S ⁺ L ⁻ M ⁺	+	-	-
<i>V. Harvey</i>	-	+	+	V	V	S ^V L ^V M ⁺	+	-	-
<i>V. hollisae</i>	-	+	+	-	-	S ⁻ L ⁻ M ⁻	+	V	-
<i>V. metchnikovii</i>	-	+	+	V	-	S ⁺ L ⁻ M ⁺	+	-	+

Tabla 1. Patrón de comportamiento de bacterias del genero *Vibrios* ante diversas pruebas recomendadas por el doctor Donald Ligtner

II Parte experimental.

El estudio se realizó en la facultad de Ciencias de la UNAN –León, en el laboratorio de microbiología de agua y el laboratorio de biología celular. Este se hizo a partir de una muestra de agua tomada en el sector de la Virgen, municipio de las Peñitas, León.

- Equipos.

- Espectrofotómetro UV/V 120 – 02
- Balanza Analítica. DHAUS; ITEM sc2020
- Incubadoras Boekel Scientific; 131400
- Cocina Sybron/Thermolyne; Sp. 18425
- Autoclave. Casa Terán: 25x - 1
- Campana. Termoforma; 1849
- Refrigerador. Kelvinator.
- Cronometro
- Shaker. Eberbach; AC 50/60c7
- Termómetro.
- PHmetro.. HEITO; PSD5

- Materiales.

- Tubos de Ensayo. Pirex.
- Espátula
- Platillos para pesar
- Gradillas.
- Balones Aferrados de 50, 100, 500, y 1000 ml. Pirex.
- Guantes. 2 MM; Reorder No. Rt - 43151
- Papel de Aluminio.

- Algodón
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml. KIMAX
- Bureta. KIMAX
- Micropipeta de 100 – 1000 uL
- Micropipeta de 10 – 100 uL
- Celdas de 1 cm
- Platos petrii desechables. 2 MM; Reorder No. RT - 1150
- Asas. 3 mm de diámetro.
- Mecheros.
- Microscopio. Westower Scientific; MC – 2205.

- **Reactivos y medios de cultivos bacteriano.**

- Agar TCBS. Scharlau; Ref. 1 – 190
- Agua peptonada. Scharlau. Ref. 2 - 277
- Agua destilada.
- NaCl
- Etanol. 96 %
- Agar TSA. Scharlau; Ref. 01 – 200
- Agar estandar.
- Agar Urea. Scharlau; Ref. 1 –261
- MR – VP. Scharlau; Ref. 2 – 207
- Sacarosa
- Manitol
- Lactosa.
- Agar O/F . Scharlau; Ref. 3 – 307

1. Procedimiento

1.1 Lavado de cristalería:

Toda la cristalería que se uso se lavo con suficiente agua y detergente, después se dejo escurrir colocados sobre papel toalla por un día, para esterilizarla con el autoclave o el horno.

1.2 Preparación de medios de cultivos.

Agar TCBS: Se suspenden 88 g. de polvo de medio de cultivo en un litro de agua destilada, agregar 2 g de Cloruro de Sodio y llevar a ebullición. Enfriar a 45 – 50° C y luego verter en placas descartables.

Agar TSA. Se agregan 40 g. De agar de medio de cultivo por litro de agua destilada, luego se agregan 2.5 g. de cloruro de sodio se mezcla y se pone a ebullición hasta alcanzar disolución completa. Este medio es esterilizado luego en autoclave a 121° C por 15 minutos. Una vez esterilizado se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45 – 50° C para verter en platos de petri dejándolo enfriar hasta que el medio se ponga sólido.

Agar estandar: Se agregan 30 g. de agar de medio de cultivo en un litro de agua destilada, luego se agregan cloruro de sodio en la concentración deseada, si esteriliza un autoclave a 121° C por 15 minutos. Una vez esterilizado se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45 – 50° C para verter en platos de petri, y se deja hasta que el medio se ponga sólido.

Agua peptonada tamponada: Se disuelven 25.5 g. de polvo de medio de cultivo en un litro de agua destilada, agregar 2.5 g de Cloruro Sodico y regular el pH a 8 +/- 0.05. Distribuir en recipientes y esterilizar al autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar O/F: Se suspenden 1.176 gramos del polvo del medio de cultivo en 120 ml de agua destilada y se lleva a ebullición, luego se distribuyen a razón de 20 ml en 6 tubos de ensayo. Se toman de 2 en 2 los tubos de ensayo para realizar cada una de las pruebas de azúcares y a los primeros 2 tubos de ensayo se le agregan 0.2 gramos de el azúcar sacaroza, a los siguientes 2 tubos de ensayo se agregan 0.2 gr de el azúcar lactosa y a los restantes 2 tubos de ensayo se agregan 0.2 gr de azúcar manitol.

Las pruebas de azúcares se realizaron en dos situaciones diferentes, se dejó un tubo para determinar si la bacteria puede utilizar la fuente carbonada en situaciones de aerobividad y otro tubo de ensayo al que se le introdujo vaselina para observar el proceso bacteriano en situación de anaerobividad. Este proceso se realizó por igual con todos los tubos de ensayo que contenían las diferentes azúcares y posteriormente se esterilizaron en el autoclave por un periodo de 15 minutos a 121°C.

Agar Urea: Se suspenden 24 gramos del polvo de medio de cultivo en 950 ml de agua destilada y llevar a ebullición. Esterilizar al autoclave durante 15 minutos a 121° C y dejar enfriar hasta 50 – 55° C. Añadir 50 ml de la solución estéril de urea y mezclar bien. Distribuir asépticamente en tubos y dejar solidificar en cuña.

Agar MR – VP: Se disuelven 17 g. de polvo de medio cultivo en un litro de agua destilada calentando si es preciso. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

1.3 Pasos para la aplicación de la tinción de Gram.

- En un porta objeto agregar una gota de agua destilada.
- Se toma una pequeña muestra de la colonia y se frota en el porta objeto (en la gota) hasta diluirse completamente.
- Se deja secar el contenido del porta objeto.

- Se aplica a la placa seca cristal violeta. Se cubre toda la placa y se deja secar por dos minutos.
- Se lava con agua destilada hasta que no queda el color violeta.
- Se aplica lugol y se deja por 1 minutos.
- Se lava el porta objeto primero con agua destilada hasta que quede tiempo y luego con etanol hasta limpiar.
- Se aplica safranina y se deja por dos minutos, luego se lava con agua destilada hasta limpiar y se deja sacar hasta que este totalmente seco.

2 Procedimiento de estudio.

2.1 Clasificación de las especies de vibrios:

- Con una botella muestreadora para recolectar muestras de agua, de 500 ml, se tomó una muestra de agua marina en el área de rompimiento de las olas. Esta se traslado,

sin tratarse, al laboratorio de microbiología de aguas, en un periodo de tiempo de 45 minutos.

- Por siembra directa se tomó un asa, de la muestra marina, y se sembró por agotamiento en un plato de petri con agar TCBS para lograr aislar selectivamente todas las bacterias del genero *Vibrios*. Este procedimiento se realizó por triplicado, donde el primer plato se sembró con 1 asa, el siguiente con 2 asas y el tercero se sembró con tres asas. Simultaneo a este proceso se sembró también en un medio enriquecido denominado agua peptonada tamponada por si acaso no se diera ningún crecimiento bacteriano en el agar TCBS.
- A las 24 horas se tomaron solamente de los platos sembrados con un asa, 2 colonias de color amarillo y una colonia color verde, donde la verde era supuesta *V. parahaemolyticus* y las amarillas supuestas *V. alginolyticus*. A estas bacterias se les realizó la tinción de gram para determinar si estas eran gram negativas y de esta forma continuar con el proceso de depuración de la colonia, por tal razón parte de esta se traslado a un medio de cultivo denominado agar TSA.
- A las 24 horas de estar en el medio de cultivo TSA, se tomaron muestras de una misma colonia y se inocularon en los medios de cultivos de agar estándar con concentraciones de 0, 3, 6, 8 y 10 % de cloruro de sodio.
- Al mismo tiempo se sembraron las diferentes especies aisladas en los medios de cultivos de agar urea, agar O/F con las diferentes concentraciones de azúcares (sacarosa, manitol y lactosa), por duplicado, dejando un tubo para prueba de oxidación y otro para prueba de fermentación y en el caldo MR - VP para realizar la prueba de Voges proskauer. En este mismo periodo de tiempo se realizó a las colonias aisladas la prueba de oxidasa.

2.2 Relación de salinidad sobre el crecimiento de la bacteria *Vibrios* sp.

- Para la realización de esta fase de estudio se realizó un segundo aislamiento utilizando el procedimiento mencionado anteriormente, donde la bacteria seleccionada proviene de una colonia color amarillo, con 2 mm de diámetro. Esta fue introducida luego en un medio de cultivo de agua peptonada tamponada, razón por la cual a esta bacteria se le denomina *Vibrios sp.*

Por tal razón simultaneo al aislamiento y depuración se preparó el medio de cultivo agua peptonada tamponada y se le corrigió el pH hasta aproximadamente 8 ± 0.05 . Se prepararon 150 ml para la prueba a 3% de NaCl y 150 ml para la prueba de 3.5% de NaCl, dejando 150 ml de agua peptonada tamponada para realizar diluciones y 100 ml como testigo.

A las 24 horas siguientes se inoculo, del plato con medio de cultivo TCBS, un asa completa de la bacteria en 30 ml del medio de cultivo agua peptonada tamponada, para realizar diluciones, se dejo por 30 minutos y luego se tomo una alícuota de 3 ml para realizar el barrido espectral desde una longitud de onda de 450 nm hasta 600 nm, para determinar la longitud de onda en la que se realizara el estudio. Este procedimiento consistió en realizar lecturas de la muestra desde los 450 nm hasta los 600nm con un intervalo entre longitudes de ondas de 5 en 5. De esta forma se encontró que a una longitud de onda de 500 nm hay una absorbancia de 0.650, siendo este el punto máximo absorbancia en el barrido espectral.

Posteriormente del plato con TCBS se inoculó, de la misma colonia, un asa conteniendo a *Vibrios sp* en los medios de cultivo de agua peptonada con concentración salina 3% y 3.5% de NaCl para iniciar el experimento. Luego se tomó una alícuota de cada medio de cultivo y se leyó su absorbancia, denominado a este punto, tiempo de lectura cero (tiempo inicial). Posteriormente se midió el pH a tiempo cero. Las lecturas en el espectrofotometro se realizaron por triplicado para reducir el error aleatorio.

Al mismo tiempo se ubicaron los balones en un shaker con una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y se continuó leyendo de acuerdo a los siguientes intervalos de tiempo.

Primer intervalo	0 – 50 minutos.
Segundo intervalo	50 – 100 minutos.
Tercer intervalo.	100 – 170 minutos.
Cuarto intervalo	170 – 220 minutos.
Quinto intervalo	220 – 255 minutos,.
Sexto intervalo	255 290 minutos.
Séptimo intervalo.	290 – 325 minutos.
Octavo minutos	325 – 370 minutos
Noveno intervalo	370 – 415 minutos
Décimo intervalo	415 – 465 minutos
Onceavo intervalo	465 – 515 minutos

Este procedimiento se realizó hasta que las muestras leídas en el espectrofotómetro no mostraron aumento significativo de absorbancia y la amplitud y disminución de los intervalos de tiempo, para realizar las lecturas, se debió a que al inicio las bacterias *Vibrios* presentaron un crecimiento muy lento y lo fueron aumentando conforme se adaptaban al tipo de nutriente y a las condiciones físicas y químicas del medio de cultivo.

3 Plan de análisis.

Se analizó el ritmo de crecimiento presentado por la bacteria utilizando la siguiente ecuación:

$$K = \frac{\log_{10} XT - \log_{10} Xo}{(0.301)t} \quad (36)$$

El valor de la constante K fue determinado por cada intervalo de lectura. De esta forma se determinó el ritmo de crecimiento presentado por *Vibrios sp* en cada intervalo de lectura en las concentraciones de 3% y 3.5% de NaCl

De la misma forma se tomo como un solo intervalo cada momento de lectura o sea de cero tiempo hasta tiempo de lectura actual para comparar el ritmo de crecimiento de *Vibrios sp* en cada concentración salina.

A la fase exponencial presentada por *Vibrios sp* en cada concentración salina se le tomo como un solo intervalo y se obtuvo la constante de crecimiento k de la bacteria. Al mismo tiempo se le realizo un análisis de regresión lineal para determinar la linealidad de la recta y encontrar la pendiente de cada concentración salina para comparar, de esta forma, el ritmo de crecimiento. Posterior a esto se procedió a comparar los resultados de la ecuación⁽³⁶⁾ y la pendiente producto de la regresión lineal.

Para predecir el aumento de la masa microbiana en el tiempo, cuando la bacteria esta en fase exponencial se puede utilizar bien la constante K encontrada en la ecuación anterior o la pendiente (b) de la curva de calibración que se encuentra a partir de la ecuación lineal $Y = a + bt$.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte experimental I

1 Clasificación de las especies de bacterias del genero Vibrios

Las tablas 2 y 3 muestran el resultado de las pruebas realizadas a cada muestra caracterizada, donde definimos crecimiento con (+) y no crecimiento con (-). Estos resultados corresponden al 50% de las pruebas recomendadas por el doctor Donald Ligtner para identificar taxonómicamente a las bacterias *Vibrios sp*. En primer instancia ser realizo en base a la tolerancia a la salinidad, para agrupar las posibles especies. Luego se siguió comparando las muestras caracterizadas en base a las pruebas de azucares, denominándolas en base a que si utilizan o no determinada fuente de carbono para la obtención de energía y

la referimos como positiva (+) ya sea que la utilice en la vía oxidativa como en la fermentativa, luego siguen las pruebas de oxidasa, ureasa y Voges Prokauer. De esta forma se venían eliminando posibilidades, conforme la disponibilidad de reactivos presentes en el laboratorio, hasta llegar a una aproximación de la bacteria representativa de la muestra.

La muestra caracterizada I (tabla 2) en la prueba de tolerancia a la salinidad nos demuestra que solamente crece entre 3% y 6% de NaCl, por lo que su metabolismo se inhibe al estar presente estas bacterias en rangos de NaCl inferiores o superiores al expuesto en el experimento. Esto pudiese deberse, a que las proteínas globulares presentes tanto en la parte externa de la pared celular como en el citoplasma tienen un rango óptimo de funcionamiento entre 3% y 6% de NaCl y, además, esta pudiese ser la concentración salina óptima en la que puede funcionar la bomba sodio – potasio – ATPasa en la célula bacteriana, para mantener en equilibrio todo el sistema celular.

Sobre la utilización de las fuentes carbonadas, se observa que de las tres azúcares presentes en el medio de cultivo agar O/F, la bacteria no utiliza ninguna de estas fuentes carbonadas en la fase oxidativa, ni en la fase fermentativa, ya que no hay viraje a color amarillo, en el medio de cultivo, debido al azul de bromotimol que actúa como indicador.

La prueba de oxidasa resultó positiva debido a que la bacteria puede producir la enzima oxidasa, donde la reacción de esta enzima se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular; por lo tanto se deduce que este organismo microscópico es aeróbico o anaeróbico facultativo. Esta característica lo hace capaz de utilizar el oxígeno molecular como un aceptor de hidrógeno final para reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno; Característica fundamental de las bacterias del género *Vibrios*.

En lo que refiere a la prueba de ureasa, se nota un resultado variado ya que el cambio de coloración del medio de cultivo no pasó del color naranja a el color rosa – fucsia, sino que solamente varió un poco el color naranja. Esta situación demuestra que la bacteria no

produce cantidades grandes de desechos nitrogenados, o sea que no tiene una fuerte actividad ureasica que permita la liberación de amoniaco para alcalinizar el medio de cultivo.

La prueba de Voges – Proskauer nos demuestra, en los tres días de incubación, que no hubo producción de 2 – 3 butanodiol y acetoina, por lo que no se dio ninguna reacción con la guanidina al realizar el ensayo. Por esta razón no se propicio la producción de compuestos coloreados, lo que nos permite decir que esta bacteria es Voges – Proskauer negativa.

Producto de este proceso se determina que la muestra caracterizada I responde al 100% de las pruebas realizadas en el laboratorio, lo que presume el comportamiento característico de *Vibrios hollisae* debido a que sus resultados son idénticos a los que expresa el Doctor Donal Ligtner⁽²⁴⁾

Tabla 2. Resultado experimental de la muestra I en el laboratorio

Especies	Salinidades %					Utilización de azucares en las fases de O/F	Oxidasa	Ureasa	Voges Proskauer
	0	3	6	8	10				
Muestra I	-	+	+	-	-	S ⁻ L ⁻ M	+	V	-

Muestra microbiologica II: *Vibrios parahaemolyticus*

La muestra microbiológica II (tabla 3) presentó un rango optimo para su crecimiento entre 3% y 8% de NaCl y al igual que la muestra I las pruebas de oxidasa, Voges – Proskauer, utilización de las fuentes carbonadas sacaroza y lactosa resultaron negativas. Solamente la prueba de oxidación – fermentación con el azúcar manitol resulto variado en ambos casos, ya que el medio de cultivo dio un pequeño viraje en la coloración, pero este color nunca llego a ser totalmente amarillo. Esta situación nos refleja que hubo en el medio de cultivo una mínima producción de acidez producto del metabolismo bacteriano, demostrándose por

la activación que nos brinda el indicador azul de bromotimol presente en el medio de cultivo Agar O/F medio fluido.

Por otro lado se observa que la bacteria en estudio no produce desechos nitrogenados ya que la coloración del medio de cultivo no vario, manteniendose el color naranja. Esta situación nos lleva a deducir que no hay liberación de amoniaco en el medio de cultivo y por ende esta bacteria es ureasa negativa.

Los resultados experimentales de la muestra II nos llevan a dilucidar que esta muestra podría pertenecer a *Vibrios parahaemolyticus*, ya que los resultados obtenidos en el laboratorio son idénticos a los que expone el doctor Ligtner en su protocolo para la detección de bacterias del genero *Vibrios* (Tabla 1).

Tabla 3. Resultado experimental de la muestra II en el laboratorio

Especies	Salinidades %					Utilización de azucares en las fases O/F	Oxidasa	Ureasa	Voges Proskauer
	0	3	6	8	10				
Muestra II	-	+	+	+	-	S ⁻ L ⁻ M ^v	+	-	-

Cabe mencionar el fenómeno ocurrido en el plato de petri sembrado con un inculo extraído del medio enriquecido agua peptonada tamponada. A las 10 horas después de la siembra todo el medio de cultivo se encontraba totalmente amarillo, lo cual demuestra que la densidad bacteriana poblacional prevaleciente en el inculo son bacterias que debido a su metabolismo acidifican el medio de cultivo. Esto causo el alargamiento de la siembra en el medio TCBS, por lo cual se volvió a sembrar un inculo proveniente del plato anterior a otro plato, y se sembró por estrías para obtener colonias aisladas. De esta forma comprobamos que aunque el medio se observa totalmente amarillo, se encontraban enmascaradas algunas colonias de color verde. Esta situación nos lleva a presumir que bajo estas condiciones físicas y químicas las bacterias que toman coloración amarilla se desarrollan mejor.

Diferente fue el caso de estas mismas bacterias después que el medio de cultivo agua peptonada se guardo en refrigeración a 4 °C por un periodo de 3 días. Se retiro de

refrigeración el medio de cultivo, se aclimato y se inoculo un asa en un medio de TCBS y a las 24 horas se observo que crecieron en un 80% colonias de color verde.

Por esta razón, es que las cepas bacterianas, caracterizadas anteriormente, no pudieron utilizarse para realizar el ensayo de la fase experimental II, ya que las cepas de *Vibrios sp* pierden viabilidad al ser sometidas a rangos de temperatura fuera de su optimo de funcionamiento.

Parte Experimental II.

1. Relación de la salinidad con el crecimiento de las bacterias *Vibrios sp*.

Las tablas 4 y 5 muestran las lecturas espectrofotometricas que reflejan los cambios en la velocidad de crecimiento experimentado por *Vibrios sp* en el laboratorio, en los medios de cultivos con 3% y 3.5% de NaCl respectivamente

Datos de lectura en el Espectrofotometro UV/Vis. CHIMADZU 120-02

Temperatura: 27 +/- 1 C

Longitud de onda: 500 nm

Numero de lectura	Tiempo en min.	Abs.	Log. Abs.	K en horas	K en el tiempo	1/K en dup/hora	1/k en el tiempo	PH
1	0	0.034	- 1.468					7.95
2	50	0.044	- 1.356	0.448	0.448	2.232	2.232	7.95
3	100	0.068	- 1.167	0.75	0.6	1.322	1.666	7.94
4	170	0.152	- 0.818	0.99	0.762	1.007	1.312	7.92
5	220	0.295	- 0.530	1.15	0.849	0.869	1.177	7.87
6	255	0.482	- 0.310	1.15	0.900	0.869	1.11	7.83
7	290	0.766	- 0.115	1.25	0.930	0.800	1.075	7.78
8	325	0.945	- 0.024	0.51	0.885	1.960	1.129	7.77
9	370	1.164	0.0659	0.39	0.826	2.564	1.210	7.76
10	415	1.263	0.1014	0.15	0.754	6.666	1.326	7.73
11	465	1.383	0.1408	0.15	0.689	6.666	1.45	7.73
12	515	1.480	0.17	0.11	0.634	9.090	1.577	7.68

Tabla 4. Resultados experimentales de *Vibrios sp* con 3% de cloruro de sodio leídos a una longitud de onda de 500 nm

Numero de lectura	Tiempo en min.	Abs.	Log. Abs.	K en horas	K en el tiempo	1/K en dup/hora	1/k en el tiempo	PH
1	0	0.047	- 1.327					7.94
2	50	0.061	- 1.214	0.452	0.452	2.12	2.21	7.94
3	100	0.087	- 1.060	0.616	0.532	1.62	1.879	7.93

4	170	0.161	- 0.793	0.760	0.626	1.31	1.597	7.91
5	220	0.280	- 0.552	0.964	0.702	1.03	1.424	7.87
6	255	0.444	- 0.352	1.139	0.762	0.87	1.312	7.85
7	290	0.658	- 0.181	0.973	0.787	1.02	1.270	7.79
8	325	0.907	- 0.042	0.791	0.788	1.26	1.269	7.74
9	370	1.185	0.073	0.509	0.675	1.96	1.481	7.74
10	415	1.300	0.113	0.177	0.583	5.64	1.715	7.73
11	465	1.464	0.165	0.208	0.498	4.80	2.008	7.73
12	515	1.589	0.201	0.144	0.435	6.94	2.298	7.70

Tabla 5. Resultados experimentales de *Vibrios sp* con 3.5% de cloruro de sodio leídos a una longitud de onda de 500 nm.

La velocidad de crecimiento de la masa bacteriana, experimentado por *Vibrios sp*, en ambas concentraciones salinas, son reflejo de las lecturas de absorbancia en el espectrofotometro, ya que la absorbancia es directamente proporcional a la masa bacteriana⁽¹³⁾. Por tal razón se deduce que en los 515 minutos experimentales, *Vibrios sp*, en ambas concentraciones salinas presento tres fases de crecimiento: Latencia, Exponencial y estacionaria (Gráficos 1 y 2)

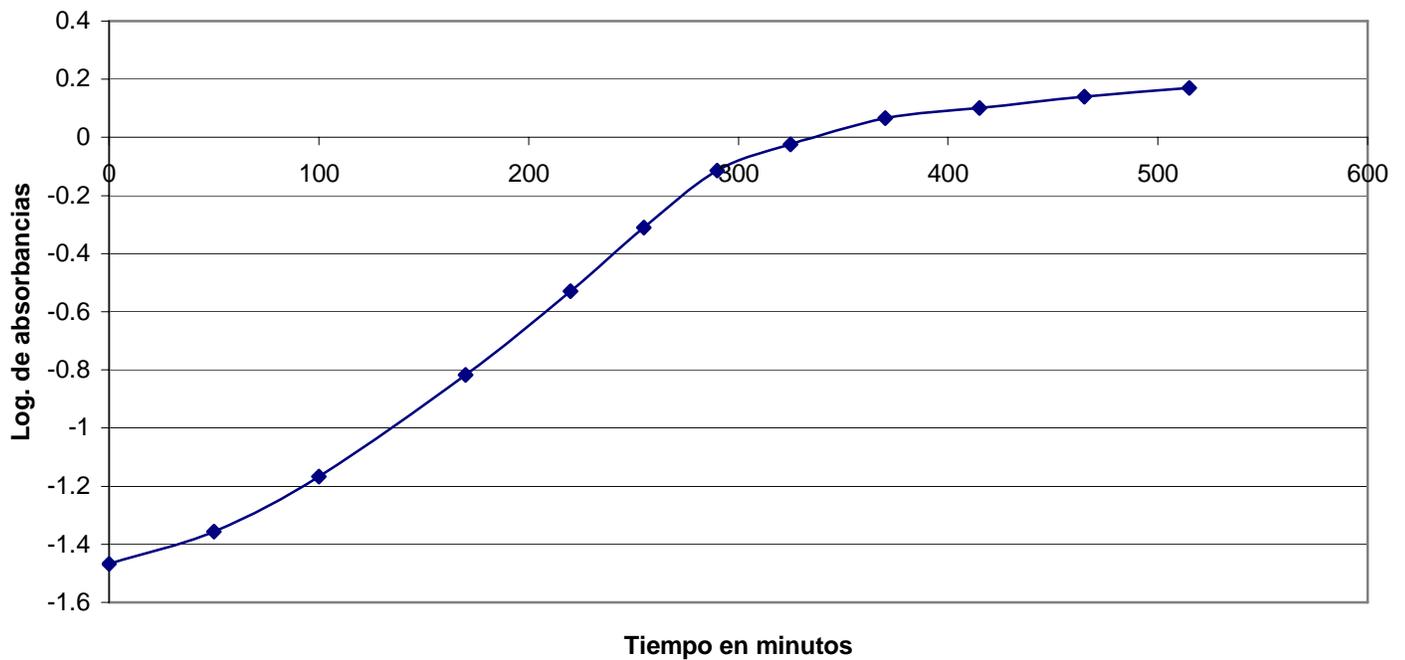


Gráfico 1. Curva de crecimiento de bacteria *Vibrios sp*. 3% de NaCl.

En la fase de latencia para ambos casos se inicia con absorbancia de 0.034 para 3% de NaCl y 0.047 para 3.5 % NaCl proporcionales a la cantidad de masa bacteriana inoculadas con el asa al inicio de la experimentación. Esta fase, tiene una duración de 100 minutos

aproximadamente (tiempo en que la masa bacteriana se duplica) y se divide en tres tiempos de lectura con ritmos de crecimientos lentos pero ascendentes, comprobados con la ecuación:

$$X_t = 2^{xT} X_0$$

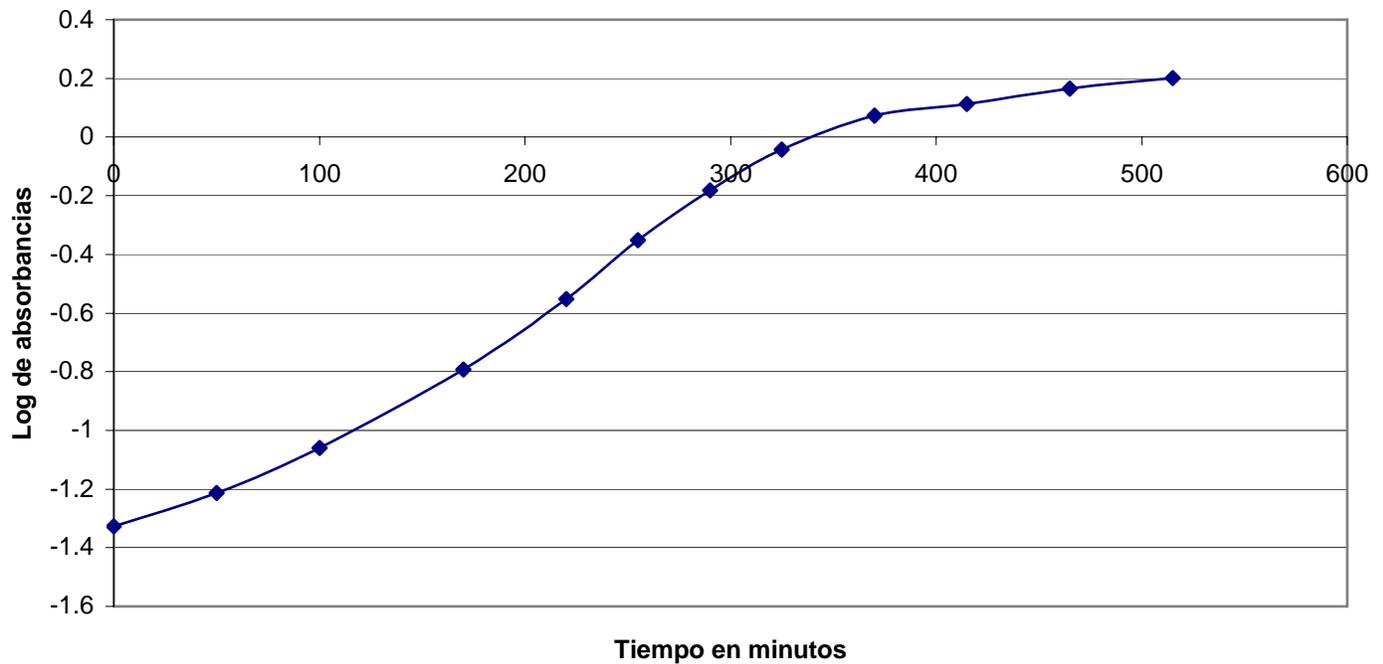


Gráfico 2. Curva de crecimiento de bacteria *Vibrios sp.* 3.5% de NaCl

*2 Factores responsables del ritmo de crecimiento en las tres fases experimentadas por la bacteria *Vibrios sp.**

2.1 Fase de latencia

Presión: Al encontrarse las células bacterianas en el medio de cultivo sólido (TCBS), estas se encontraban sometidas únicamente a la presión atmosférica y al inocularse en el medio de cultivo líquido la presión que se ejerce sobre la pared celular y membrana es mucho mayor, lo que obligo a las células a aumentar su turgencia. Esta pudiese ser la causa de la muerte de

muchas de las células al momento de la inoculación y, además, una de las responsables que la bacteria presentara fase de latencia.

El medio de cultivo inicial: La conformación nutritiva del medio de cultivo sólido (TCBS) le facilita a la bacteria desarrollar su metabolismo con facilidad ya que este es exclusivo para el crecimiento de *Vibrios sp*, Pero al trasladar la bacteria a un nuevo medio de cultivo, agua peptonada tamponada, esta tiene que adaptarse a los nuevos nutrientes, donde su fuente principal de carbono son los aminoácidos presentes en el medio, por lo que el enzima sacarosa fosforilaza u otras que pudo haber sintetizado anteriormente no son funcionales para su metabolismo actual. Esta situación obligo a *Vibrios sp*. a sintetizar algunos enzimas específicos que no poseía y, por ende, este pudo ser el factor regulador del ritmo de crecimiento en los primeros 100 minutos del estudio, al que denomino fase de latencia.

Como se observa, la fase de latencia no presenta una duración significativa en tiempo, esto se argumenta con el hecho que *Vibrios sp*. presenta al momento de la resiembra algunas enzimas que biodegradan los nutrientes presentes en el agua peptonada tamponada.

Temperatura: La bacteria se encontraba encubándose con una temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y al bajarle la temperatura a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ todas las reacciones de oxidación – reducción bajaron su nivel de actividad con respecto a la velocidad de crecimiento que presentaban en la temperatura anterior, inhibiendo de esta forma algunas proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares sensibles a las variaciones de temperatura. Cuando hay variación de temperatura las proteínas globulares sufren un descenso en su solubilidad, lo que no les permite realizar sus actividades de transporte y catálisis al 100%, pero este efecto fue superado ya que se nota que en el segundo intervalo de tiempo (50 – 100 minutos) se habían adaptado a esta temperatura y estaban realizando sus funciones metabólicas de manera normal tanto en el citoplasma como en la membrana y pared celular. Por tal razón aunque la bacteria hubiese estado en fase exponencial a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ inicia fase de latencia a $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

El pH: será discutido con más énfasis al final del análisis de la fase exponencial, pero un punto importante a discutir aquí es que la bacteria proviene de un medio de cultivo en TCBS con pH aproximadamente 8.6 y al inocularla en agua peptonada con pH de $7.95^{+/-} 1$ la variación de este pudo haber disminuido el funcionamiento enzimático de algunas proteínas globulares propiciado junto a los factores anteriores el inicio de la fase de latencia de *Vibrios sp.* Es importante destacar que este factor en este momento no pudiese ser tan representativo para afirmar su responsabilidad en la fase de latencia de la bacteria ya que se observó un cambio de coloración en el medio de cultivo sólido de verde a amarillo, propiciado esto por el azul de bromotimol, el cual actúa como indicador de la variación del pH en el medio de cultivo TCBS. Esta situación se sustenta con el conocimiento de que la colonia bacteriana de color amarillo producto de su metabolismo aumenta la cantidad de iones H^+ lo que ayuda a presumir que el pH del medio de cultivo TCBS pudo estar bastante cercano al pH del agua peptonada al momento de la resiembra. Condición que hace menos probable la incidencia directa de este factor en el crecimiento de la bacteria en su fase inicial de cultivo

Salinidad: La diferencia entre el ritmo de crecimiento de *Vibrios sp.* a 3% y 3.5% de NaCl inicia a observarse en la fase de latencia, a partir del segundo intervalo 50 – 100 minutos, donde $K_{3\%} = 0.75 > K_{3.5\%} = 0.616$.

Igualmente ocurre al tomar toda la fase de latencia como un solo intervalo 0 – 100 minutos.

$K_{3\%} = 0.6 > K_{3.5\%} = 0.532$ (Grafico 6)

El responsable principal de esta situación es la diferencia de 0.5% de NaCl, entre los medios, ya que este influye en los efectos estabilizadores en la célula, disminuyendo o aumentando la actividad de algunas enzimas específicas de la pared celular, membrana y citoplasma. Tal es el caso específico de las proteínas denominadas porinas que atraviesan toda la membrana externa y interna de la célula. Estas proteínas actúan como canales de entrada y salida de numerosas sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular, y el ion Na^+ puede ser uno de los factores estabilizadores para la regulación y funcionamiento de estas enzimas. No obviando la acción que pudiese tener la temperatura y el pH. (ver fig 1)

2.1.2 Fase exponencial: Esta ratifica el comportamiento presentado en toda la fase de latencia, y pone en evidencia que aunque las bacterias del género *Vibrios* son halófilos obligados, que pueden crecer en concentraciones de NaCl de 0.3% hasta 10% (según la especie), presentan una concentración optima para su crecimiento, denotando en este estudio que *Vibrios sp.* crece más rápidamente en una concentración de NaCl al 3% que a 3.5%; por lo que a 3% de NaCl el Ion Na^+ favorece mas la estabilidad de la membrana celular, y un factor importante es que muchos de sus enzimas desarrollan mejor sus actividades con esta concentración de Na^+ . No obviando, que esta no pudiese ser su concentración de NaCl optimo para su desarrollo. (Grafico 3)

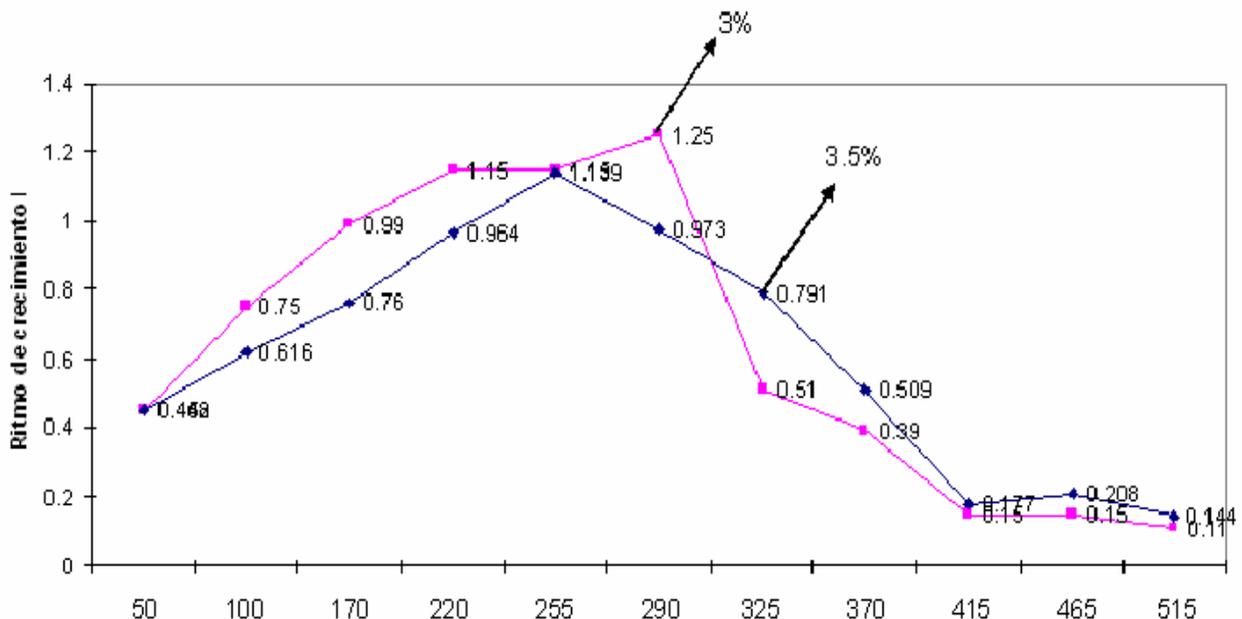


Gráfico 3. Ritmo de crecimiento de la bacteria *Vibrios sp.* a 3% y 3.5% de NaCl

Pasado los cien minutos en el medio de cultivo agua peptonada, *Vibrios sp.* en ambas concentraciones salinas, experimenta un ritmo de crecimiento mayor. Esto se debe a que las células están adaptadas al medio de cultivo, o sea, ya han sintetizado todas las coenzimas esenciales y otros constituyen para obtener su energía del medio de cultivo.

Hay una marcada diferencia entre el ritmo de crecimiento experimentado por *Vibrios sp.* en concentración salinas 3 % y 3.5 % ya que a 3 % en el intervalo 100 - 170 minutos, después de

la fase latencia, experimenta un ritmo de crecimiento de $K = 0.99$ duplicaciones por hora (d/h) necesitando a este ritmo 1.01 hora para duplicarse. (gráfico 3)

Luego pasado 50 minutos de la anterior lectura aumenta su ritmo a $K = 1.15$ d/h, a este ritmo si se mantuviera, solamente requeriría a 0.86 horas para duplicar la masa celular en el medio. Igual ritmo presento a los 35 minutos siguientes. A los 190 minutos de estar en fase exponencial experimento su máximo ritmo de crecimiento y alcanzo $K = 1.25$ d/h, requiriendo solamente 0.8 hora para duplicar toda la masa celular. (gráfico 7)

Diferente es la fase exponencial presentada en el medio con 3.5 % de salinidad ya que su crecimiento es cierto que va aumentando con referencia a la fase de latencia pero es inferior al que experimento en la concentración salina del 3 %

- A 70 minutos en la fase exponencial su ritmo de crecimiento fue $K = 0.760$ y el tiempo requerido para duplicar su masa fue $1/K = 1.31$ horas.
- A 120 minutos en fase exponencial $K = 0.964$ y $1/K = 1.03$ horas.
- A 155 minutos experimentó su mayor ritmo de crecimiento con un $K = 1.139$ duplicaciones por hora y $1/K = 0.87$ horas.

- A 190 minutos experimenta un pequeño descenso en el ritmo de crecimiento $k = 0.973$ d/horas y $1/k = 1.02$ horas y a 225 minutos presenta un $k = 0.791$ y $1/k = 1.26$ horas.(grafico 4)

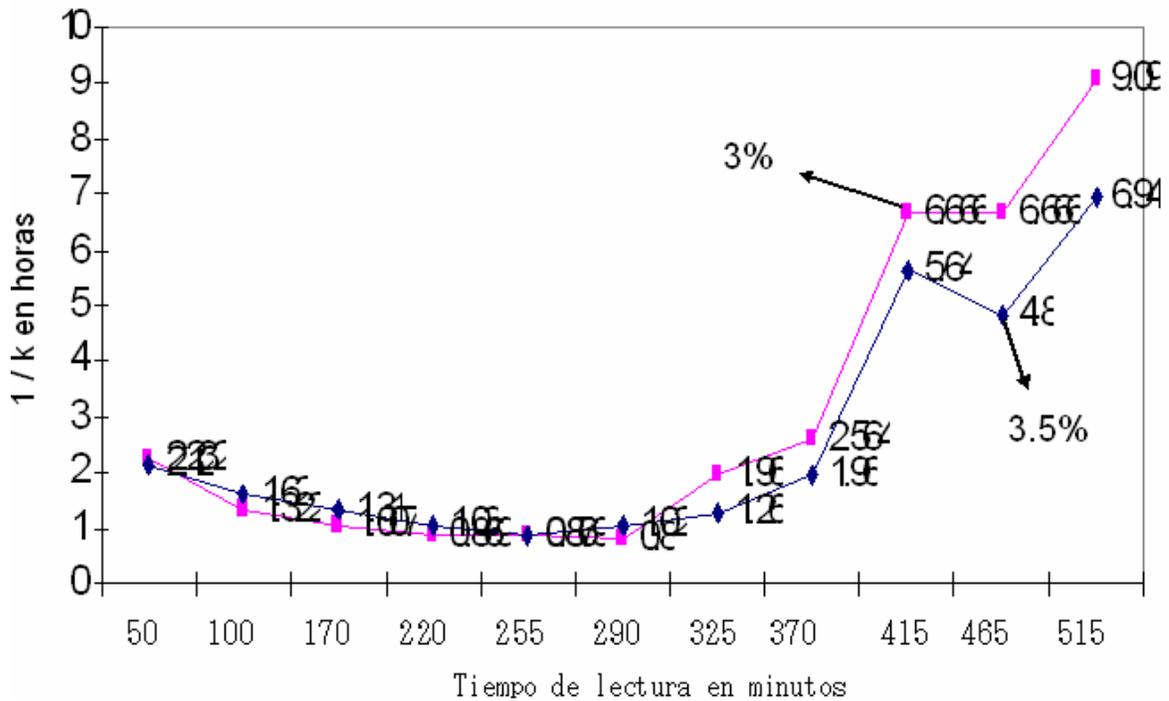


Grafico 4 Tiempo estimado para que la población de *vibrios sp* a 3% y 3.5% de NaCl se duplique.

Como se puede observar el ritmo de crecimiento en la fase exponencial para la bacteria en la concentración 3.5% no fue tan rápido a como lo experimento en la concentración de 3% de salinidad, pero si, esta fase fue mas larga terminando a los 325 minutos con un K = 0.791. Este efecto se atribuye a que *Vibrios sp.* experimento, desde el inicio, un mayor ritmo de crecimiento en la concentración 3%, por ende hubo mayor aumento de desechos metabólicos derivados de la biodegradación de los aminoácidos, ya que cuando estos son utilizados como fuente de carbono lo que se libera es el grupo amino que da como resultado un ácido orgánico (grafico 3).

No podemos obviar la influencia que puede generar el pH en el crecimiento bacteriano ya que las enzimas de la pared celular de las bacterias *Vibrios sp.* presentan un pequeño grupo de aminoácidos específicos polares y no polares que se afectan en dependencia del grado de acidez o basicidad del medio. Cuando *Vibrios sp.* modifiko producto de su metabolismo el pH, este pudiese haber afectado la composición química del ácido glutámico, ácido aspártico y treonina que son aminoácidos polares con cargas OH y O⁻ en sus grupos R, lo

que incidió en la funcionabilidad de las enzimas en el péptido glucano. Este factor químico se presume que pudo haber incidido en la permeabilidad de la pared celular de la bacteria, perdiendo las propiedades biológicas de la pared celular y membrana celular afectando directamente las proteínas que actúa como canales de entrada y salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular. (figura 1).

En el medio con 3.5% se observa que cuando la bacteria alcanza su máximo K el pH del medio de cultivo se encuentra a 7.85 diferente al 7.78 de la concentración al 3% esta situación pudiese ser la que facilitó la caída drástica del ritmo de crecimiento en el medio con 3% de salinidad y mantuvo con un ritmo de crecimiento de ascenso y descenso en la fase exponencial casi similar a la bacteria en la concentración con 3.5 % de NaCl. (grafico3)

Es interesante el hecho de la caída del pH cuando la bacteria alcanza su máximo ritmo de crecimiento en ambas concentraciones salinas, porque el agua peptonada presenta los componentes químicos: fosfato disódico y fosfato monopotásico que actúan como tampones, o sea que independientemente de la adición al medio de iones H^+ el pH no se modifica drásticamente. Por tal razón, esta situación no nos permite conocer el verdadero valor de pH que tendría el medio sin los reguladores tampones y por ende el verdadero trabajo de la bacteria al biodegradar los aminoácidos. (grafico 5)

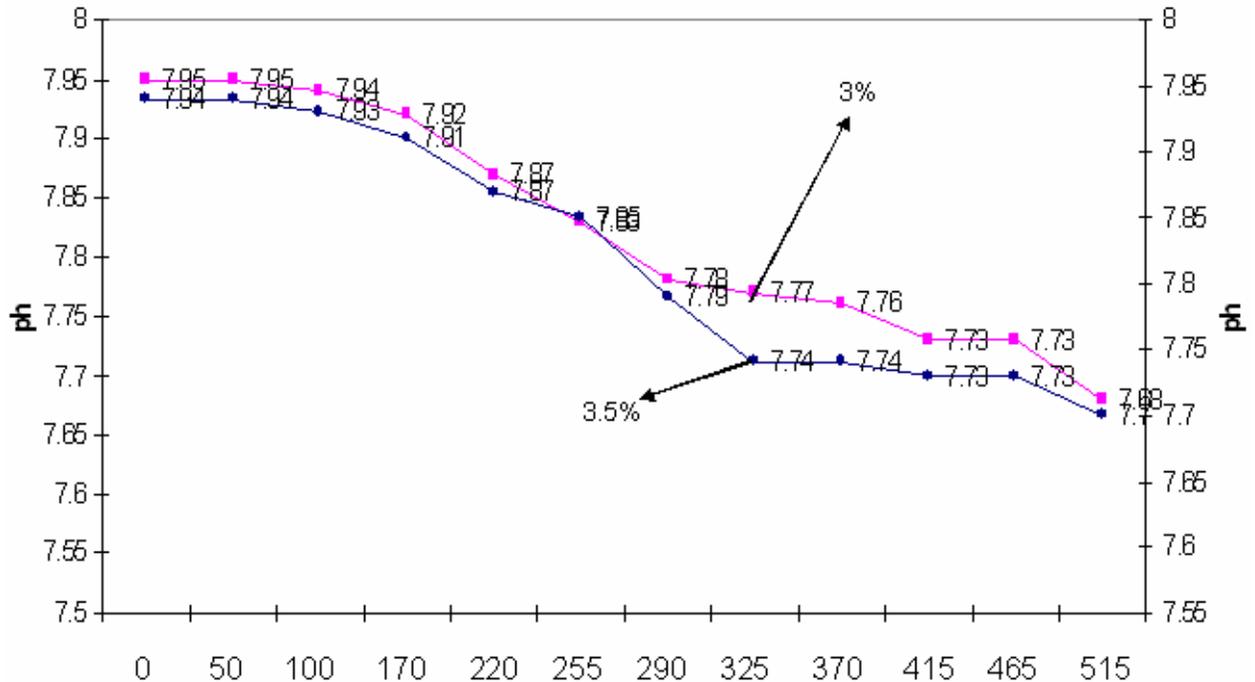


Gráfico 5 Variación en tiempo del pH a 3% y 3.5% de NaCl

2.1.3 Fase estacionaria: El proceso de crecimiento desarrollado por *Vibrios sp.* en la fase estacionaria hasta el tiempo de estudio (515 minutos) no se detuvo, ya que la masa bacteriana continuo creciendo lentamente.

Para *Vibrios sp.* con 3 % de salinidad se presenta absorbancia de 0.097 mas que en la lectura anterior a 465 minutos y en la concentración de 3.5 % hay 0.085 mas de absorbancia. Por tal motivo, aunque es lógico que muchas células en el medio de cultivo pueden estar muriendo, por los factores antes mencionados, hay algunas que todavía se están duplicando, esta es la razón por lo que se detecta aumento en la masa celular. Afirmando así que falta para llegar al punto máximo de concentración de masa celular en el medio de cultivo y por ende no se presenta fase de muerta en esta investigación.

Un punto importante a analizar es que el agua marina presenta un pH entre 8 y 8.5, este puede ser el factor que facilitó el crecimiento de la bacteria en el laboratorio y al ir esta

bajando el pH del medio de cultivo, propicio su propia muerte ya que sus enzimas y demás compuestos biológicos de la pared y membrana celular pudieron sufrir desnaturalización. No obviando, además, el posible agotamiento de los nutrientes presentes en el medio de cultivo agua peptonada.

Si tomásemos el ritmo de crecimiento, en cada momento de lectura como un solo tiempo, observamos que desde cero hasta el tiempo de lectura K siempre es mayor a 3% que a 3.5%. Igual resultado obtenemos de cero hasta los 515 minutos totales de estudio, donde K siempre es mayor a 3 % que a 3.5 %, igual es el caso para 1/k para la primera concentración $k = 0.634 \text{ d/h}$ y $1/k = 1.577 \text{ h}$.

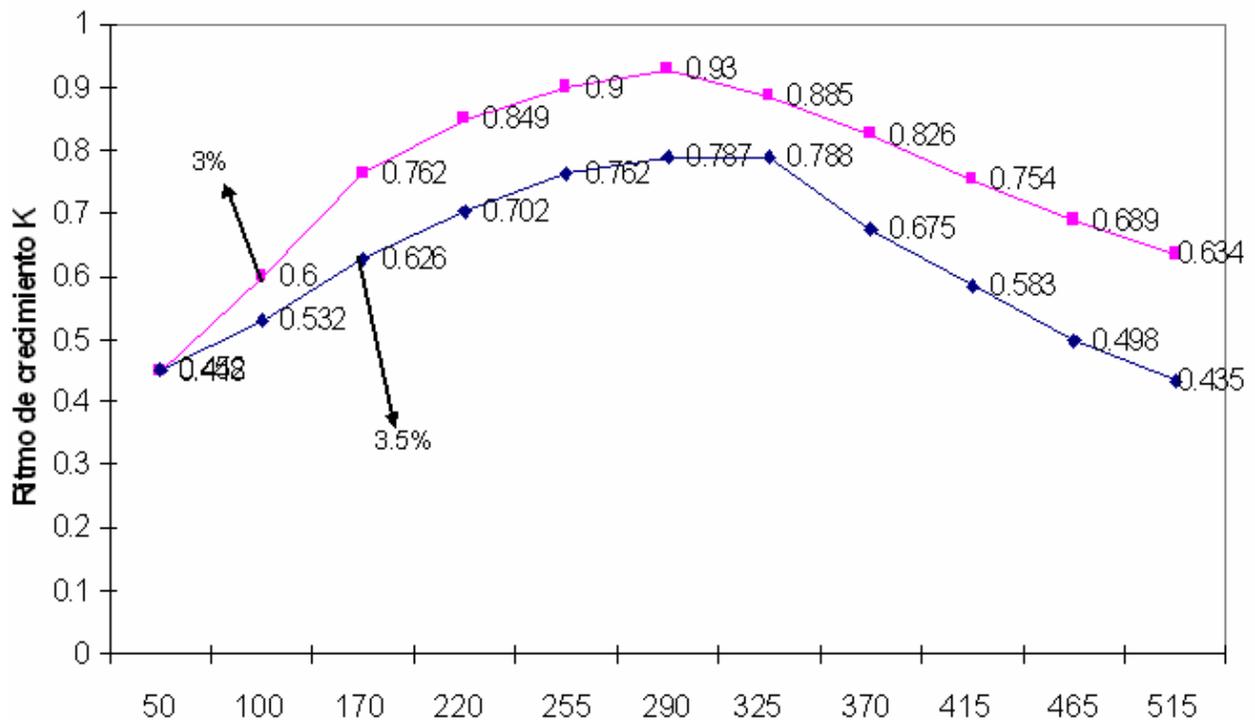


Gráfico 6. Ritmo de crecimiento experimentado por *Vibrios sp* a 3% y 3.5% de NaCl en el tiempo.

Para la segunda concentración $k = 0.435 \text{ d/h}$ y $1/k = 2.298 \text{ h}$. Requiriendo la bacteria para esta concentración mas tiempo para duplicar su masa bacteriana que cuando esta en un medio de cultivo con 3% de NaCl.(grafico 7)

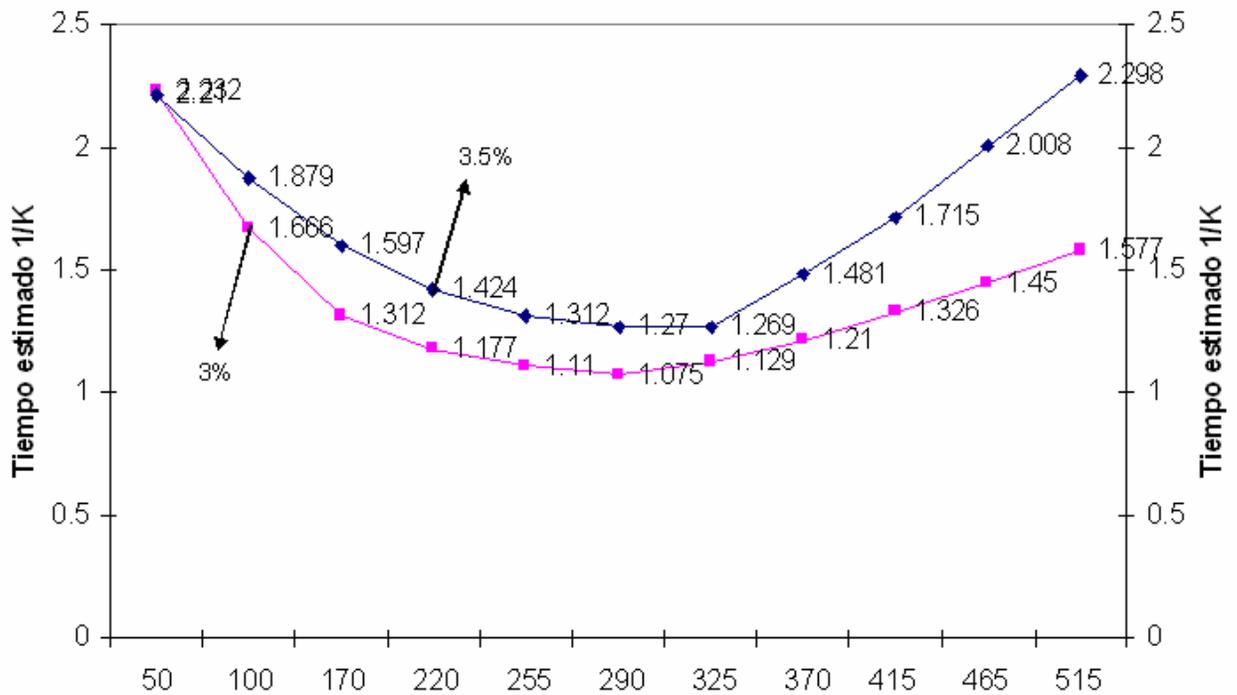


Gráfico 7. Variación del tiempo estimado para que la población de *Vibrios sp* se duplique a 3% y 3.5% de NaCl.

3. Análisis de regresión lineal a los datos de la fase exponencial

La tabla 6 muestra los valores, en tiempo, logaritmo de las absorbancias y los logaritmos de las absorbancias corregidos, para obtener un valor constante de K, en toda la fase exponencial, para de esta forma predecir la masa bacteriana en el tiempo, siempre y cuando la bacteria se encuentre en un medio con similares condiciones al estudiado en el laboratorio.

Tabla 6. Valores de tiempo y absorbancia de los puntos obtenidos en la fase exponencial de *Vibrios sp*.

Análisis de regresión para 3% de NaCl	Análisis de regresión para 3.5% de NaCl
---------------------------------------	-----------------------------------------

Tiempo	Log. abs	Log. Abs. Corr.	Tiempo	Log. abs	Log. Abs. Corr.
0	- 1.167	- 1.185	0	- 1.060	- 1.086
70	- 0.818	- 0.794	70	- 0.793	- 0.760
120	- 0.530	- 0.515	120	- 0.552	- 0.527
155	- 0.310	- 0.320	155	- 0.352	- 0.364
190	- 0.115	- 0.124	190	- 0.181	- 0.201
			225	- 0.042	- 0.038

3.1 Curva de calibración:

La tabla 7 refleja la linealidad de la curva con una solución de NaCl al 3%. Esta nos da un coeficiente de regresión $r^2 = 0.998$ por lo cual podemos decir que existe una correlación lineal entre el tiempo de incubación y los valores del logaritmo de las absorbancias, el error típico es igual a 2.075×10^{-2} . Los intervalos de confianza para un beta al 95%, para el intercepto son: $a = -1.241$; -1.121 y para la pendiente $b = 0.005$; 0.006

Salinidades	3% de NaCl		3.5% de NaCl
Valores de K	1.058	>	0.928
Valores de 1/k	0.945	<	1.077
Valores de la pendiente	0.0056	>	0.0047

Como se puede observar en la tabla anterior el valor de la constante K es mayor para la fase exponencial con concentraciones salina 3% que para la concentración salina 3.5%. Afirmando así que: el ritmo de crecimiento para *Vibrios sp.* es mayor a 3% que a 3.5% de NaCl, el tiempo para que la masa celular se duplique es menor, y se confirma encontrando la pendiente de la recta donde esta es mayor a 3% que a 3.5%

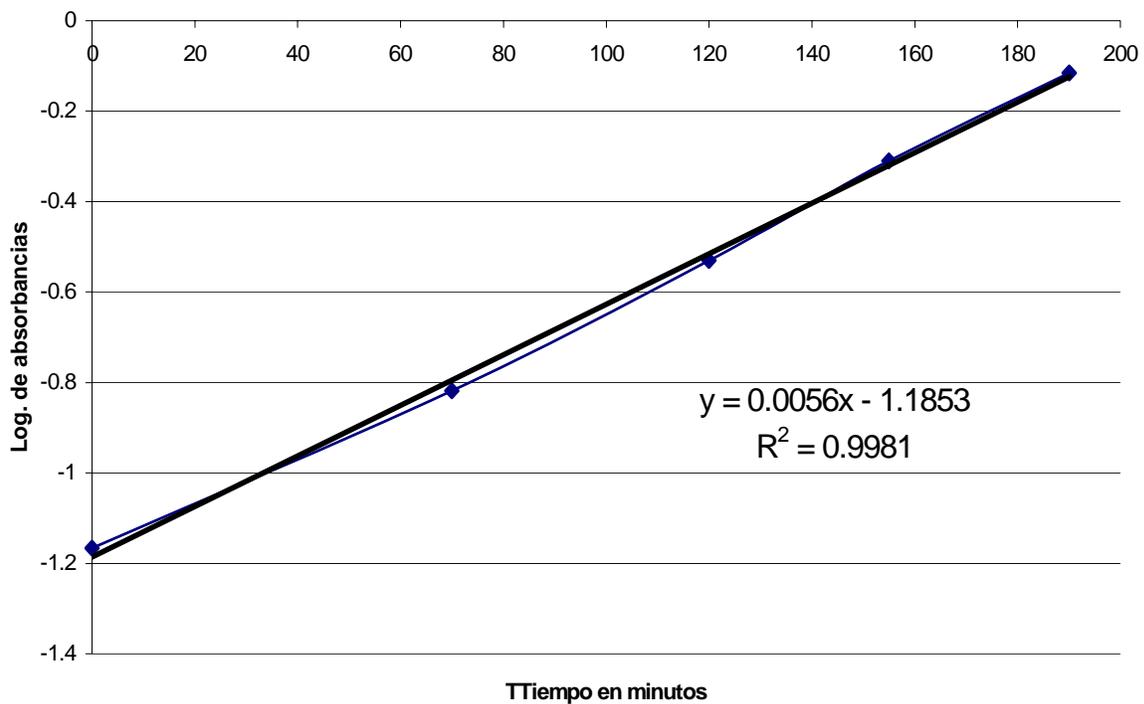


Gráfico 8 Curva de calibración de la fase exponencial para 3% de NaCl.

La linealidad de la curva con una solución de NaCl al 3.5% nos da un coeficiente de regresión $r^2 = 0.996$ por lo cual podemos decir que existe una correlación lineal entre el tiempo de incubación y los valores de los logaritmos de las absorbancias, el error típico es igual a $2.715 \text{ E} - 0.2$. Los intervalos de confianza con un beta al 95% para el intercepto son: $a = -1.147$; -1.026 y para la pendiente $b = 0.004$; 0.005 .

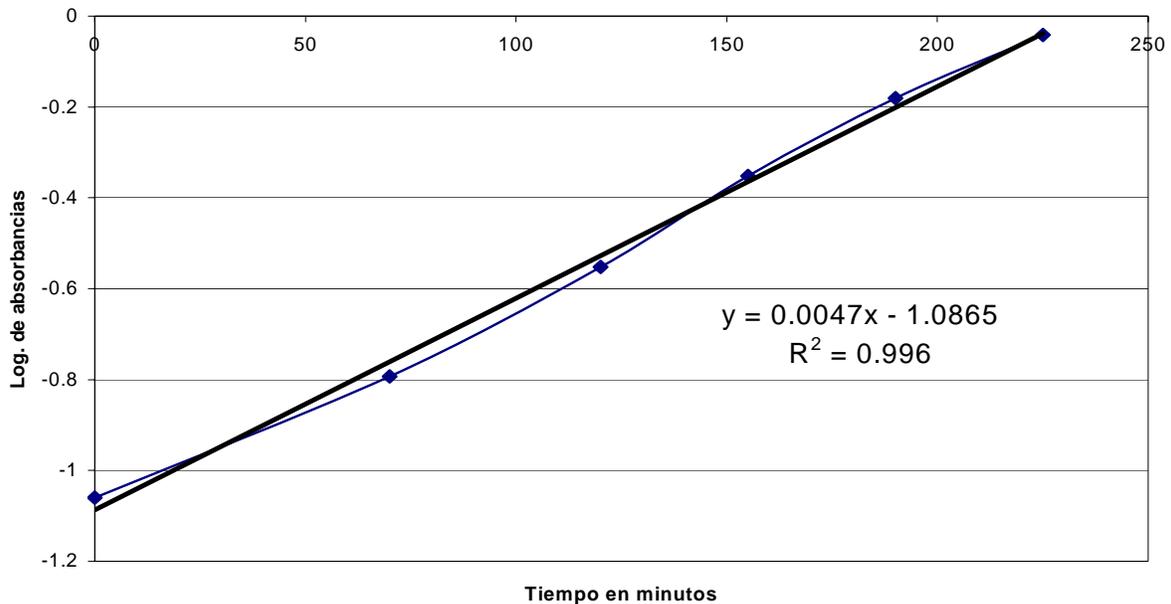


Gráfico 9 Curva de calibración de la fase exponencial para 3.5% de NaCl.

IV Conclusión.

Del aislamiento realizado a las bacterias del genero *Vibrios*, se encontró que prevalecen más las especies de *Vibrios* que producto de su metabolismo tienden a acidificar el medio de cultivo TCBS. Por tal razón en el medio natural marino, hay mayor densidad de las especies de bacterias que facilitan la reacción del azul de bromotimol.

De las bacterias aisladas se lograron caracterizar dos especies:

- *Vibrios hollisae*

- *Vibrios paraheamolyticus*.

En la determinación del ritmo de crecimiento de *Vibrios* ante diferentes concentraciones de NaCl se encontró que, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, esta se desarrolla mejor en concentración de 3% que en 3.5 % de NaCl; por tal razón la constante de crecimiento en fase exponencial es mayor a 3% que a 3.5% en las dos modelos aplicados

El máximo ritmo de crecimiento lo alcanzó *Vibrios sp.* a los 290 minutos en el medio de cultivo agua peptonada tamponada con 3% de NaCl y a los 255 minutos en el medio de cultivo agua peptonada tamponada con 3.5% de NaCl

En los 515 minutos de estudio el pH del medio de cultivo agua peptonada tamponada, con 3% de NaCl varió de pH = 7.95 en su fase inicial a pH = 7.68 en la fase final y para el medio de cultivo agua peptonada tamponada con 3.5% de NaCl varió de pH 7.94 a pH = 7.70.

V Recomendaciones

No realizar ningún tratamiento a la muestra de agua extraída del medio marino para poder obtener resultados veraces sobre la distribución y abundancia de las bacterias *Vibrios sp.*

Realizar estudios sistemáticos sobre la caracterización de las bacterias del genero *Vibrios* en los todos los meses del año para determinar la abundancia de las especies. Este trabajo es recomendable hacerlo en base a dos parámetros:

- a) Si los desechos metabólicos de la bacteria reaccionan con el azul de bromotimol provocando la variación del color en el medio de cultivo TCBS de verde a amarillo.
- b) Si los desechos metabólicos de la bacteria no provocan la reacción del indicador azul de bromotimol. Por lo que el medio de cultivo TCBS no varia su color verde

Analizar el posible fenómeno de algunas colonias que inicialmente presentan coloración verde y después de 48 horas de incubación estas comienzan a tomar coloración amarilla.

Realizar estudios bioquímicos con las enzimas de las bacterias del genero *Vibrios* para determinar la prevalencia de cada especie en rangos de temperatura desde 25 °C hasta 30 °C y de esta forma relacionar el grado de actividad enzimática.

Llevar a cabo estudios sobre la caracterización de las especies de *Vibrios* procurando realizar todas las pruebas recomendadas en el protocolo propuesto por el doctor Donald Ligtner, para establecer con mayor seguridad las especies prevalecientes.

VI Bibliografía

- 1- Odum, Eugene. "Ecología". Nueva editorial interamericana, 3^{er} Edición, Mexico. (1982).
- 2- <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia>. 2003
- 3- Jory, Darryl. "Memorias del primer congreso latinoamericano de camaronicultura". Republica de Panama, Panama.(1998).
- 4- <http://www.geocities.com/christopHbeck/aquatips.html>. 2002
- 5- <http://www.ecoproduct-ecu.com/es/es-acuiz.html>. 2002

- 6- <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fdivul.html>.2002
- 7- <http://www.aquanetsa.com/insumos.html>.2002
- 8- <http://www.britanialab.com.ar/>. 2002
- 9- Carrasco, Amada y Martinez Anabell. “Validación del método Azul de Indofenol aplicado a la determinación de nitrógeno amoniacal en aguas”. Departamento de Química, UNAN – León, Nicaragua, (1999).
- 10- Delgado, Gustavo y Zapata, Benito. “Capacitación en el manejo del espectrofotómetro UV/V con arreglo de diodos acoplados a una computadora 486. Departamento de Química UNAN – León, Nicaragua, (1994).
- 11- Willard H, Merrit I, Dean J. “Métodos instrumentales análisis, C.E.C. S.A, Mexico, (1981).
- 12- Gonzalez, Raimundo. “Microbiología de los productos marinos”. Editorial pueblo y educación, Habana, Cuba, (1983).
- 13- Brock, Tomas y Madigan, Michael. “Biología de los microorganismos”. 4^{ta} Edición, Prentice Hall hispanoamericana, Mexico, (1987).
- 14- Carpenter, Philip. “Microbiology”. Philadelphia, Estados Unidos, (1963).
- 15- Carter, Charles F. “ Microbiology and pathology”. 3^{er} Edición, The E. V. Mosby Company, Estados Unidos, (1944).
- 16- Carter, Charles F. “ Principles of microbiology”. 2^{er} Edición, St. Luis Mosby Company, Estados Unidos, (1954).

- 17- Fernandez Rubiera, Pedro. “Microbiología de conserva de frutas y vegetales”. Editorial pueblo y educación, Habana, Cuba, (1983).
- 18- Delgado Campos, Giovanni. “Determinación espectrofotométrica del PKa de metilo y rojo de alizarina”. UNAN – León, Nicaragua, (1971).
- 19- Ruiz, Mario. “Determinación química del contenido proteínico del chayote por espectrofotometría en luz visible”. UNAN – León, (1976).
- 20- Arauz, Adriana. “Determinación de la concentración de alopurinol en medio ácido y alcalino por espectrofotometría”. UNAN – León, (1987).
- 21- Garcia, Maria Lourdes. “Estandarización de una técnica analítica para el acetaminofeno por espectrofotometría visible”. UNAN – León, (1987).
- 22- Hernández, Maria Elena. “Estandarización del método analítico de la carbamazepina por espectrofotometría”, UNAN- León, (1991).
- 23- Berrios, Josefa Auxiliadora. “Valoración de la vitamina B₁₂ por espectrofotometría”. UNAN – León, (1969).
- 24- Lightner, Donald. “A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp”. Universidad de Arizona, Estados Unidos, (2000).
- 25- Alday, V. y Flegel, T. “Diagnosis of shrimp disease”. Multimedia Asia Co. Ltd, Bangkok, Thailandia, (1999).
- 26- Clifton, Charles. *Annual review of microbiology*. N^o 6, (1965).

- 27- Huss, H. *FAO Documento técnico de pesca*, N° 334, (1997), 55.
- 28- Brock, Thomas. “Biología de los microorganismos”. 2^{da} edición, editorial Omega, Barcelona, España, (1978).
- 29- Lehninger, Albert. “Bioquímica”, 2da Edición, editorial pueblo y educación, Habana, Cuba. (1981).
- 30- Piatkin, K. “Microbiología con virología e inmunología”. 2^{da} Edición, Editorial Mir, Moscú, (1986).
- 31- Brock, Tomas. “Biology of microorganisms”. 3^{ta} Edición, Prentice Hall hispanoamericana, Mexico, (1979).
- 32- Barzizza, Carlos. “Microbiología.” 6^{ta} Edición, librería machete, Buenos Aires, Argentina, (1952).
- 33- Frobisher, Martin. “ Fundamentals of Microbiology”. 6^{ta} Edición, Philadelphia, Estados Unidos, (1953).
- 34- Jawetz, Ernest. “Manual de microbiología medica”. 9^{na} Edición, Editorial el manual moderno, Mexico, (1981).
- 35- Leyva, Virginia y Valdez, Biana. *Alimentacion y nutricion*, N° 10, (1996).
- 36- Brock, Thomas; Madigan Michael. “Microbiología” . 6^{ta} Edición, prentice hall hispanoamericana. México. (1993).
- 37- Madigan, Michael et. al. “Biología de los Microorganismos” 8^{va} Edición, Prentice hall, INC. Madrid, España. (1997)

38- Villae, Claude A. “Biología”. 8^{va} Edición, McGraw – Hill. México (1996)

39- Campbel, R. “Ecología microbiana”. Limusa, Mexico (1987).

Anexos

Análisis de variancia realizado a los datos que reflejan el ritmo de crecimiento de la bacteria *Vibrios sp* en un medio de cultivo de agua de peptona tamponada, con 3% de salinidad.

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	.999 ^a	.998	.998	2.075E-02

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo en minutos

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	.691	1	.691	1604.998	.000 ^a
	Residual	1.292E-03	3	4.307E-04		
	Total	.693	4			

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo en minutos

b. Variable dependiente: Logaritmos de las absorvancias

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	-1.185	.018		-67.492	.000	-1.241	-1.129
	Tiempo en minutos	5.583E-03	.000	.999	40.062	.000	.005	.006

a. Variable dependiente: Logaritmos de las absorvancias

Análisis de variancia realizado a los datos que reflejan el ritmo de crecimiento de la bacteria *Vibrios sp* en un medio de cultivo de agua de peptona tamponada, con 3.5% de salinidad.

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	.998 ^a	.996	.995	2.715E-02

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo en minutos

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	.733	1	.733	993.657	.000 ^a
	Residual	2.949E-03	4	7.372E-04		
	Total	.736	5			

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo en minutos

b. Variable dependiente: Logaritmos de las Absorvancias

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	-1.087	.022		-49.957	.000	-1.147	-1.026
	Tiempo en minutos	4.657E-03	.000	.998	31.522	.000	.004	.005

a. Variable dependiente: Logaritmos de las Absorvancias

Barrido espectral para determinar la longitud de onda optima
en la que se realizara el estudio

nm	abs	nm	abs
450	0.612	530	0.626
455	0.619	535	0.619
460	0.626	540	0.613
465	0.632	545	0.602
470	0.639	550	0.592
475	0.646	555	0.581
480	0.644	560	0.571
485	0.662	565	0.566
490	0.671	570	0.557
495	0.682	575	0.549
500	0.687	580	0.540
505	0.677	585	0.531
510	0.688	590	0.524
515	0.659	595	0.517
520	0.647	600	0.510
525	0.637	605	0.502