

## PRESENCIA DE VIBRIONACEAS EN EL TRACTO DIGESTIVO DE CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS (BRUGUIERE, 1789) (MOLLUSCA; MURICIDAE).

Manuel Márquez, Pamela Chávez y Carlos Riquelme\*

**ABSTRACT.** Occurrence of vibrionaceas in the digestive tract of the mollusc, *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789) (Mollusca; Muricidae).

The bacterial flora in the digestive tract of the mollusc, *Concholepas concholepas* was investigated and the isolated strains were classified to the level of genera. Viable counts in the intestine ranged from  $2.8 \cdot 10^6$  CFU/g -  $2.3 \cdot 10^5$  CFU/g. *Vibrio* was the dominant genera followed by *Acinetobacter* and *Moraxella*. *Vibrio* strains, were tentatively identified as *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio logei* and *Vibrio alginolyticus*. Although, there are several strains of *Vibrio* was not possible to identified to species level. The presence of new species within the "Intestinal *Vibrio* Group" of *Concholepas concholepas* is suggested.

**Key words:** Mollusc, Microflora, Intestine, *Vibrio*.

### INTRODUCCION

El estudio de la microflora Intestinal de organismos marinos se ha intensificado en los últimos años, en parte debido, a las posibles aplicaciones que, eventualmente, se podrían derivar del conocimiento de ella, como por ejemplo, el control de la producción de toxinas (Matsui et al. 1989), la producción de ácido Eicosapentanoico (EPA) (Yazawa et al. 1988) y la importancia nutricional para el huésped (MacDonald et al. 1986).

Uno de los primeros estudios de la microflora Intestinal de organismos marinos fue realizado por Liston (1957), quien puso en evidencia la presencia de un grupo de vibrionas, denominado "grupo *Vibrio* Intestinal", los que predominaban en el Intestino del lenguado. A partir de este estudio, existen una gran cantidad de investigadores que han señalado la presencia de bacterias del género *Vibrio* en el tracto digestivo de peces (Sera et al. 1974

\* Departamento de Acuicultura, Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta. Casilla 170, Antofagasta, Chile.

García-Tello & Robeson 1984, Strom & Olafsen 1990, Genovese et al. 1990), crustáceos (Yasuda & Kitao 1980) y moluscos (Vial et al. 1988).

Entre los moluscos, *Concholepas concholepas* posee un particular interés biológico, ya que es la única especie sobreviviente del género *Concholepas* y su desarrollo en acuicultura se presenta como de alto interés comercial. Sin

embargo, la información existente sobre su bacteriología en general, particularmente acerca de su microflora intestinal, es escasa o inexistente.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la flora bacteriana y, en particular, determinar la presencia de Vibrionáceas en el tracto digestivo de *Concholepas concholepas*.

## MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron nueve ejemplares de *C. concholepas* desde las zonas Intermareal y submareal de la bahía de San Jorge, Antofagasta (23°27'S, 70°30'W). Estos fueron trasladados al laboratorio donde se efectuó su disección en forma aséptica. Se extrajo la porción del Intestino correspondiente a la primera porción, inmediatamente posterior al estómago hasta la glándula rectal (Fig. 1), ésta fue lavada reiteradas veces con agua de mar estéril para eliminar la microflora transiente en el fluido Intestinal. La muestra de Intestino fue macerada y homogenizada en agua de mar esterilizada por filtración Millipore GS 0,22 µm; diluciones seriadas de esta solución fueron sembradas en triplicado en placas de medio marino LT10, el que contiene (gramos/litro) Agar 15, Polipeptona 5, extracto de Levadura 0,5, glucosa 1 y Citrato Férrico 2,5 \*

10<sup>-5</sup>. Las placas fueron incubadas a 20°C durante 7 días.

De las colonias desarrolladas en LT10 se aislaron al azar un total de 121 colonias, las cuales fueron purificadas y luego caracterizadas según el esquema de Muroga et al. (1987), y el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (1984), para lo cual se realizaron las siguientes pruebas: Gram, Motilidad, Pigmentos, Oxidasa, Fermentación y producción de gas a partir de Glucosa, sensibilidad al Agente Vibriostático (0/129), Requerimientos de NaCl, Arginina Dihidrolasa, Lisina y Ornitina Decarboxilasa, Crecimiento a diferentes Temperaturas, hidrólisis de gelatina, producción de ácido a partir de Manitol y Arabinosa, Amilasa, Vogues-Proskauer, Rojo de Metilo, Indol, Crecimiento a 0% y 10% de NaCl, y Crecimiento en TCBS.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El número de células viables por gramo de Intestino de *C. concholepas* fluctuó

entre 2,8\*10<sup>6</sup> y 2,3\*10<sup>5</sup>, lo cual concuerda con lo obtenido para grupos de

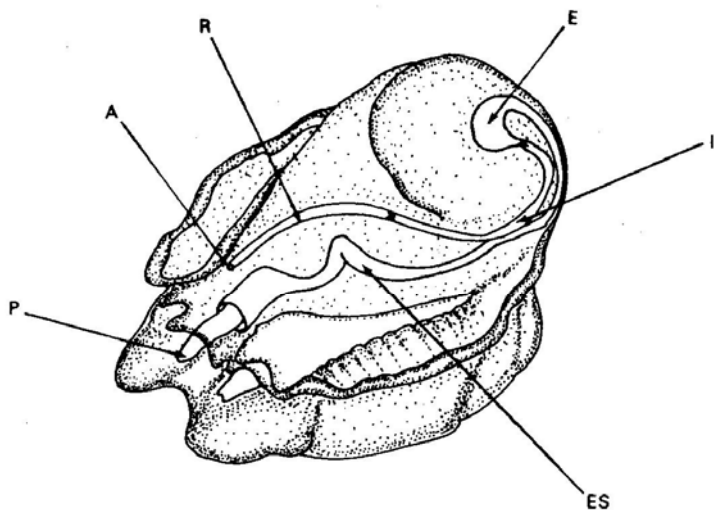


Fig. 1. Esquema del aparato digestivo de *Concholepas concholepas*. (Modificado de Huaquín 1966). P: Probóscis; ES: Esófago; E: Estómago; I: Intestino (entre asteriscos, porción extraída); R: Recto; A: Ano.

peces y crustáceos en Japón, así por ejemplo, Muroga et al. (1987) reporta una cantidad muy similar en *Pagrus major* y *Acanthopagrus schlegell*, del mismo modo, Yasuda & Kitao (1980), reportan un valor similar para *Penaeus japonicus*. Sin embargo, hay poca información sobre microflora intestinal de moluscos; existen datos sobre bacterias del tracto intestinal de *Mesodesma donacium* (García-Tello & Mulhauser 1976) que difieren de los resultados obtenidos para *C. concholepas*.

Los grupos bacterianos predominantes

encontrados en *C. concholepas* estuvieron constituidos por bacterias de los géneros *Vibrio*, seguido de *Acinetobacter* y *Moraxella* (Fig. 2). Trabajos recientes de Genovese et al. (1990), Onarheim & Raa (1990) y Sakata (1990), reportan que los géneros *Vibrio*, *Acinetobacter* y *Moraxella* son los de mayor ocurrencia en el tracto intestinal de peces, crustáceos y moluscos, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Las características bioquímicas de las Vibrionáceas encontradas, son pre-

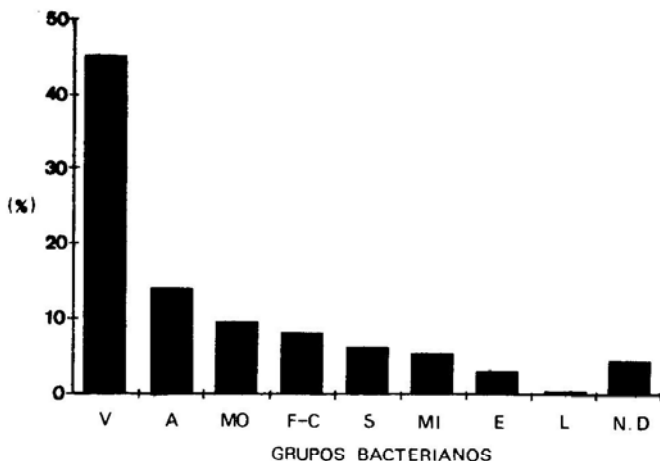


Fig. 2. Porcentaje de grupos bacterianos encontrados en el tracto intestinal de *Concholepas concholepas*. V: *Vibrio*; A: *Acinetobacter*; MO: *Moraxella*; F-C: *Flavobacterium - Cytophaga*; S: *Staphylococcus*; MI: *Micrococcus*; E: *Enterobacteriaceae*; L: *Levadura*; N.D.: No Determinado.

sentadas en la Tabla 1. De acuerdo con el Manual de Bergey (1984) en el grupo correspondiente al género *Vibrio*, se identificaron tentativamente a nivel de especie *V. logei* (cepa 7), *V. metschnikovii* (cepa 11) y *V. alginolyticus* (cepa 18); sin embargo, con la mayoría de las cepas existen diferencias con las especies tipos descritas. Este mismo problema se ha mantenido desde el hallazgo de este "Grupo de *Vibrios* Intestinales" por Liston (1957) hasta nuestros días (Onarheim & Raa 1990). La clasificación de este grupo ha sido muy difícil, todos son sensibles al

Agente Vibriostático O/129, pero difieren sustancialmente en las pruebas rutinarias descritas en el Manual de Bergey (1984). Estos resultados nos permiten sugerir que habrían nuevas especies de *Vibrios* dentro de la microflora intestinal de *C. concholepas*.

El porcentaje de *Vibrionáceas* encontrado en el presente trabajo en relación al resto de la microflora viable, puede ser comparado con los trabajos realizados en peces por Muroga et al. (1987), Tanasomwang & Muroga (1989) y Morii & Kasama (1989), en crustáceos,

por Suzuki et al. (1990) y Godoy et al. (1990); no obstante la información proporcionada para moluscos por García-Tello & Mulhauser (1976) y Vial et al. (1988) muestra diferencias apreciables con nuestros datos de *C. concholepas*. Sugerimos que la diferencia observada

se debe a que los moluscos estudiados por estos autores, son fitoplanctófagos, y el género *Vibrio* presenta una correlación negativa con el fitoplancton (Riquelme et al. 1989), en cambio *C. concholepas* presenta un claro hábito alimentario de tipo carnívoro.

TABLA 1. Pruebas realizadas a las cepas de *Vibrio* sp. aisladas desde la microflora intestinal de *C. concholepas*.

PRUEBAS CEPAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
GRAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOTILIDAD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PIGMENTOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXIDASA	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
GAS DE GLUCOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SENSIBILIDAD A O/129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REQUERIMIENTO DE NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARGININA DIHIDROLASA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
LISINA DECARBOXILASA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ORNITINA DECARBOXILASA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CRECIMIENTO A:																								
50°C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
37°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+	+	+
44°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
HIDROLISIS DE GELATINA	-	*	*	*	*	*	*	*	*	+	*	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	-	-	-
PRODUCCION DE ACIDO DE:																								
MANITOL	*	-	*	+	+	+	+	+	+	-	+	*	+	-	*	*	*	+	-	-	*	+	-	+
ARABINOSA	*	+	-	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	*	-	-
AMILASA	*	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	-	-
VOGUES-PROSKAUER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*	+	+	
ROJO DE METILO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+	+	+
INDOL	*	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CRECIMIENTO A:																								
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCBS	A	*	A	A	A	V	A	A	V	A	*	V	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

(#) A= Colonias Amarillas, V= Colonias Verdes, F= Fermentativa, \* = No determinado

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos la valiosa ayuda de la Prof. Sra. Marcela Clarke y de Eduardo Padilla en la disección de los especímenes estudiados. Al Prof. Sr. Raúl Castro R., por su colaboración en la ilustración de *C. concholepas* y al Asistente Técnico Sr. Exequiel Lillo A., por su cooperación en la recolección de los ejemplares.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Proyecto FONDECYT 3505-89 e IFS 1595-1.

### LITERATURA CITADA

- Baumann, P. & R.H.W. Schubert. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (ed. by N.R. Krieg & J.G. Holt). Williams & Wilkins, London, 1: 516-550.
- García-Tello, P. & H. Mulhauser. 1976. Microorganism and organic matter in the feeding of *Mesodesma donacium* Lam. (Mollusca: Pelecypode). *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, Warszawa, 23: 277-280.
- García-Tello, P. & J.P. Robeson. 1984. Presencia y homogeneidad bioquímica del "Grupo vibrio intestinal" en el tracto digestivo de *Merluccius gayi*. *Boletín Instituto de Salud Pública, Chile*, 25: 198-201.
- Genovese, L., Crisafi, E., Greco, S. & R. Zaccoine. 1990. Intestinal microflora of farmed fish. In: R. Lésel (eds), *Microbiology in poecilotherms. Proceeding of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford. p. 193-198.
- Godoy, V., García-Tello, P. & J. Robeson. 1989. Bacterias entéricas en el tracto intestinal de *Cancer porteri* (Crustacea: Brachyura). *Revista de Biología Marina, Valparaíso*, 24 (2): 155-160.
- Huaquín, L. 1966. Anatomía de *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789). (Gastropoda: Muricidae). Memoria para optar al título de Profesora de Ciencias Naturales con mención en Biología. Universidad Católica de Chile, Escuela de Pedagogía, Santiago, Chile. 53 p.
- Liston, J. 1957. The occurrence and distribution of bacterial types on flatfish. *Journal of General Microbiology*, 16: 205.
- MacDonald, N.L., Stark, J.R. & B. Austin. 1986. Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *Microbiology letters* (35): 107-111.

- Matsui, T., Takesugu, S., Kodama, K., Ishii, A. & C. Shimizu. 1989. Production of tetrodotoxine by the intestinal bacteria of a Puffer Fish *Takifugu niphobles*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (12): 2199-2203.
- Morii, H. & K. Kasama. 1989. Bacterial flora in the digestive tracts of Mudskipper fishes *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus cantonensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (4): 733-741.
- Muroga, K., Higashi, M. & H. Keitoku. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed Red Seabream (*Pagrus major*) and Black Seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) larval and juveniles stages. *Aquaculture*, 65 (1): 79-88.
- Onarheim, M.A. & J. Raa. 1990. Characteristics and possible biological significance of an autochthonous flora in the intestinal mucosa of sea-water fish. In: R. Lésel (eds), *Microbiology in poecilotherms. Proceeding of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford. p. 197-201.
- Riquelme, C., Fukami, K. & Y. Ishida. 1989. Growth response of bacteria to extracellular products of bloom algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (2): 349-356.
- Sakata, I. 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shell-fish. In: R. Lésel (eds), *Microbiology in poecilotherms. Proceeding of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford. p. 171-176.
- Sera, H., Ishida, Y. & H. Kadota. 1974. Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish. In: Colwell, R., R. and R. Y. Morita (eds), *Effect of the ocean environment on microbial activities*. p. 467-490. University Park Press, Baltimore.
- Strom, E. & J. Olafsen. 1990. The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. In: R. Lésel (eds), *Microbiology in poecilotherms. Proceeding of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford. p. 181-184.
- Suzuki, K., Muroga, K., Nogami, K. & K. Maruyama. 1990. Bacterial flora of cultured swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae. *Fish Pathology*, 25 (1): 29-36.
- Tanasomwang, V. & K. Muroga. 1989. Intestinal microflora of Rock Fish *Sebastes schlegeli*, Tiger Puffer *Takifugu rubripes* and Red Grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. *Nippon Suisan Gakaishi*, 55 (8): 1371-1377.

- Vial, M., Teuber, C., Costabal, P., Poblete, T., Donoso, T. & M. Gebauer. 1988. Presencia de *Vibrio anguillarum* (Canestrini) en el tracto digestivo de *Mytilus chilensis* (Hupe). *Biota*, 4 (2): 119-124.
- Yasuda, K. & T. Kitao. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of Prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 19 (3): 229-234.
- Yazawa, K., Araki, K., Watanabe, K., Ishikawa, C. & K. Hashimoto. 1988. Eicosapentaenoic acid productivity of bacteria isolated from fish intestines. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (10): 1835-1839.