Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente, 28 (1 & 2). 165 - 169 (1989); 2 figs.

EFECTO ANTIBIOTICO DE TRES BACTERIAS MARINAS EN LA SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE LA VIEIRA PECTEN ZICZAC INFECTADAS CON EL GERMEN VIBRIO ANGUILLARUM

C. LODEIROS, L. FREITES, E. FERNANDEZ, A. VELEZ y J. BASTARDO *

Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

** Escuela de Ciencias, Dpto. de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela*

RESUMEN: Se estudió la capacidad antibiótica de tres bacterias marinas sobre la supervivencia de larvas del pectinido *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. Los resultados sugieren la posibilidad de utilizar una de estas bacterias (*Flavobacterium sp.* P14) y sus sustancias antibacterianas como biocontrol y antibiótico, respectivamente, en la prevención y control de enfermedades bacterianas en cultivos larvarios de bivalvos marinos.

ABSTRACT: The antibiotic capacity of three marine bacteria and their antibiotic substances on the larval survival of the scallop *Pecten ziczac* infected with the germ *Vibrio anguillarum* was studied. The results showed the possibility of using one of these bacteria (*Flavobacterium sp.* P14) and its antibacterial substances as a biocontrol and as antibiotic, respectively, in bacterial diseases prevention and control in larval cultures of marine bivalves.

INTRODUCCION

El papel ecológico que juegan los antibióticos producidos por microorganismos marinos ha sido discutido extensivamente. Estudios recientes han propuesto la posible utilidad que estos antibióticos puedan tener en la prevención y control de enfermedades en acuicultura (DOPAZO *et al.*, 1988; LODEIROS *et al.*; 1988a, b). Sin embargo, hasta la fecha, no se han realizado análisis "*in vivo*" de su efecto en organismos acuáticos enfermos a fin de determinar su posible aplicación en sistemas de cultivo masivo.

En el presente trabajo se ha determinado el efecto de tres bacterias productoras de sustancias antibacterianas sobre la supervivencia de larvas de la viera *Pecten ziczac* infectada y no infectada con el germen patógeno de bivalvos *Vibrio anguillarum* EPp3.

MATERIALES Y METODOS

Bacterias utilizadas:

Para la realización de los análisis se escogieron tres cepas marinas productoras de sustancias antibacterianas, en función de sus mayores espectros de inhibición ante bacterias patógenas en organismos acuáticos, obtenidas por LODEIROS *et al.* (1988b). Dichas cepas fueron indentificadas como *Alteromonas* sp x 24, *Pseudomonas* sp. P12 y *Flavobacterium* sp. P14. Cada una de estas tres bacterias fueron sembradas por extensión en dos placas de agar marino (MA; Difco) e incubadas a 23-25°C durante 2-4 días para obtener un extracto antibiótico según las recomendaciones de BAREFFOT y KLAENHAM (1983). Dicho extracto fue concentrado por liofilización y restituido en 10 ml de buffer de extracción [TRIS-HC1/pH 7.7 (0.1 M NaC1/0.01 M EDTA)].

Como germen patógeno para inducir la enfermedad necrosis bacilar en las larvas de la vieira *Pecten ziczac*, se utilizó la cepa *Vibrio anguillarum* EPp3, aislada de una epizootia establecida en el sistema de cultivo de la Estación Hidrobiológica de Turpialito ("hatchery") del Instituto Oceanográfico de Venezuela (Edo. Sucre), cuya patogenicidad ha sido comprobada en los bivalvos tropicales *Perna perna* y *Pecten ziczac* (FREITES, 1989 en preparación).

Todas las bacterias utilizadas en el bioensayo fueron

cultivadas en agua de mar, envejecida, estéril y enriquecida con caldo marino (MB; Difco) al 25%, incubándose a 23-25°C/18-24h.

Cultivos larvarios:

Para establecer actividades de cultivo, se obtuvieron ejemplares adultos del pectínico *Pecten ziczac*, extraídos de sus poblaciones naturales, las cuales se encuentran ubicadas en el Golfo de Cariaco (Edo. Sucre-Venezuela). Con la finalidad de someterlos a condicionamiento, los pectínicos se mantuvieron bajo temperaturas de 3-5°C por encima de la observada en los bancos naturales y alimentación continua. Posteriormente el desove se indujo mediante choques térmicos y mecánicos según las recomendaciones de VELEZ *et al.* (1988).

Determinación de los efectos en los cultivos larvarios:

Los cultivos líquidos y los extractos de los cultivos sólidos, de las bacterias productoras de sustancias antibacterianas, se utilizaron para comprobar sus efectos antibióticos de una forma preventiva ante la enfermedad larvaria necrosis bacilar (inducida con el germen *Vibrio anguillarum* EPp3) en los cultivos larvarios de *Pecten ziczac*. De igual manera, se observó el efecto de dichos cultivos en larvas no infectadas. Los efectos antibióticos o nocivos en estos tratamientos sobre las larvas, se determinaron indirectamente observando la proporción de larvas muertas a las 18 h, después de iniciada la experimentación, la cual consta de los siguientes ensayos:

Cultivos larvarios	Determinación de:
1) Sin tratamiento (Control)	– La viabilidad de las larvas.
2) Con el patógeno	– La efectividad patógena del gérmen.
3) Con el extracto antibiótico	– Efecto del antibiótico en las larvas
4) Con el extracto antibiótico y el patógeno	– Efectividad del antibiótico ante el patógeno.
5) Con la bacteria productora	– Efecto de la cepa productora sobre las larvas.
6) Con la bacteria productora y el patógeno	– Antagonismo entre la bacteria productora y el patógeno.

Los pasos a seguir en este análisis se representan esquemáticamente en la Fig. 1.

EXPERIMENTACION

Cada uno de los ensayos, se realizaron con lotes de 800-1000 larvas de cinco días de edad, las cuales se mantuvieron en 200 ml de agua mar filtrada y bitratada con luz ultravioleta, contenidas en envases de vidrio previamente desinfectados por cloración. Dichos contenedores se colocaron en una bandeja con agua clorada, con la finalidad de crear un ambiente isotérmico y prevenir algún tipo de contaminación accidental.

Los cultivos bacterianos y extractos antibióticos concentrados y restituidos, en los diferentes tratamientos fueron suministrados asepticamente a razón de 0.1 ml, en los envases de vidrio conteniendo las larvas de *Pecten ziczac*.

La experimentación se realizó, en cada caso, en réplicas de 9 lotes de larvas, utilizándose para establecer comparaciones entre ellos la prueba no paramétrica de KRUSKAI - WALLIS, para luego aplicar pruebas aposteriori de comparaciones múltiples, según las recomendaciones establecidas por CONOVER (1980).

RESULTADOS Y DISCUSION

La Fig. 2 muestra la media de la proporción de mortandad larvaria en los diferentes tratamientos y su relación de igualdad y desigualdad significativa ($p \leq 0.005$), en ella se deduce que tanto las cepas *Pseudomonas* sp. P12 y *Alteromonas sp.* x 24, y sus extractos antibacterianos producen efectos novicos en las larvas de *Pecten ziczac*, no cumpliendo con el principio de toxicidad selectiva, formulado para antibióticos de uso humano a principios de siglo por Paul Ehrlich, quien sostuvo que un antibiótico eficaz no debe afectar a los tejidos del individuo infectado y ser tóxico para el agente infectante (AHARONOWITZ & COHEN, 1981). Pudiéndose caracterizar, en tal caso, que las sustancias antibacterianas producidas por las cepas *Pseudomonas* sp. P12 y *Alteromonas* sp. x24, son tóxicas ante larvas de *Pecten ziczac*, sin excluir que ambas cepas pudieran poseer una acción invasiva.

Aunque los procesos generales del metabolismo celular son similares en organismos procariotas y eucariotas, en este caso invertebrados, existen sutiles diferencias que pueden hacer que una sustancia inhibitoria sea letal para el agente infectante e inofensivo para el infectado, lo cual es una propiedad esencial de la acción de un buen

antibiótico. Tal caso ocurrió con la cepa *Favobacterium* P14, donde se determinó que en los tratamientos donde se encontraba involucrada la cepa y/o extracto antibacteriano, no se producían efectos nocivos significativos en las larvas de *Pecten ziczac*, pudiéndose, además, comprobar que en dichos tratamientos se disminuía la acción del agente patógeno *Vibrio anguillarum* EPp3 en los cultivos larvarios de *Pecten ziczac*. Por otra parte, los resultados demuestran que dicha cepa pudiera ser más útil como biocontrol, puesto que no hay diferencias significativas en cuanto a mortandad larvaria de *Pecten ziczac*, entre el tratamiento de la cepa en presencia del agente patógeno y el control; sin embargo, si existen diferencias significativas entre el tratamiento con extracto antibacte-

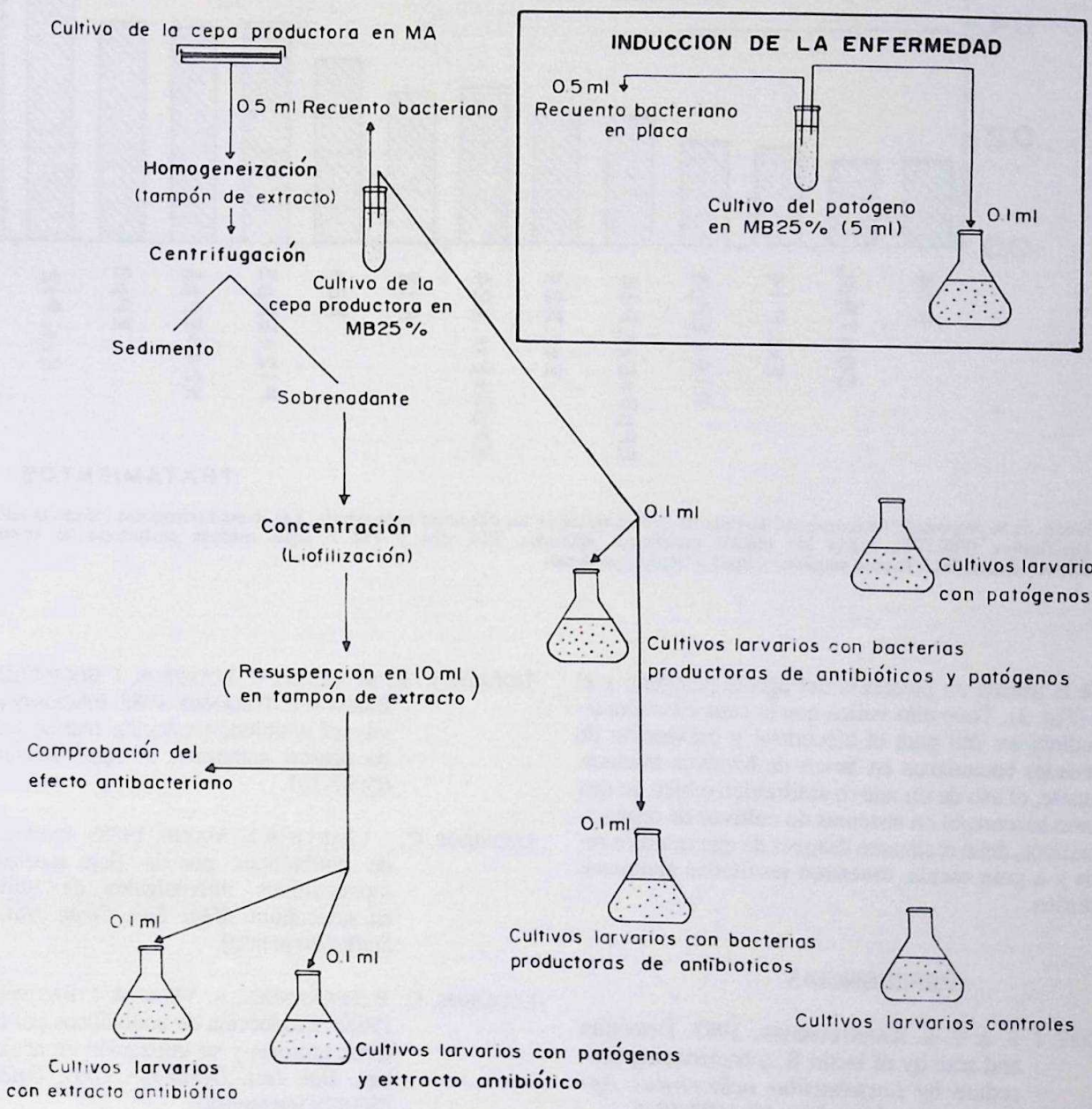


Fig. 1.- Representación esquemática de los tratamientos para la determinación del efecto de las bacterias marinas y sus extractos antibióticos ante larvas de *Pecten ziczac*.

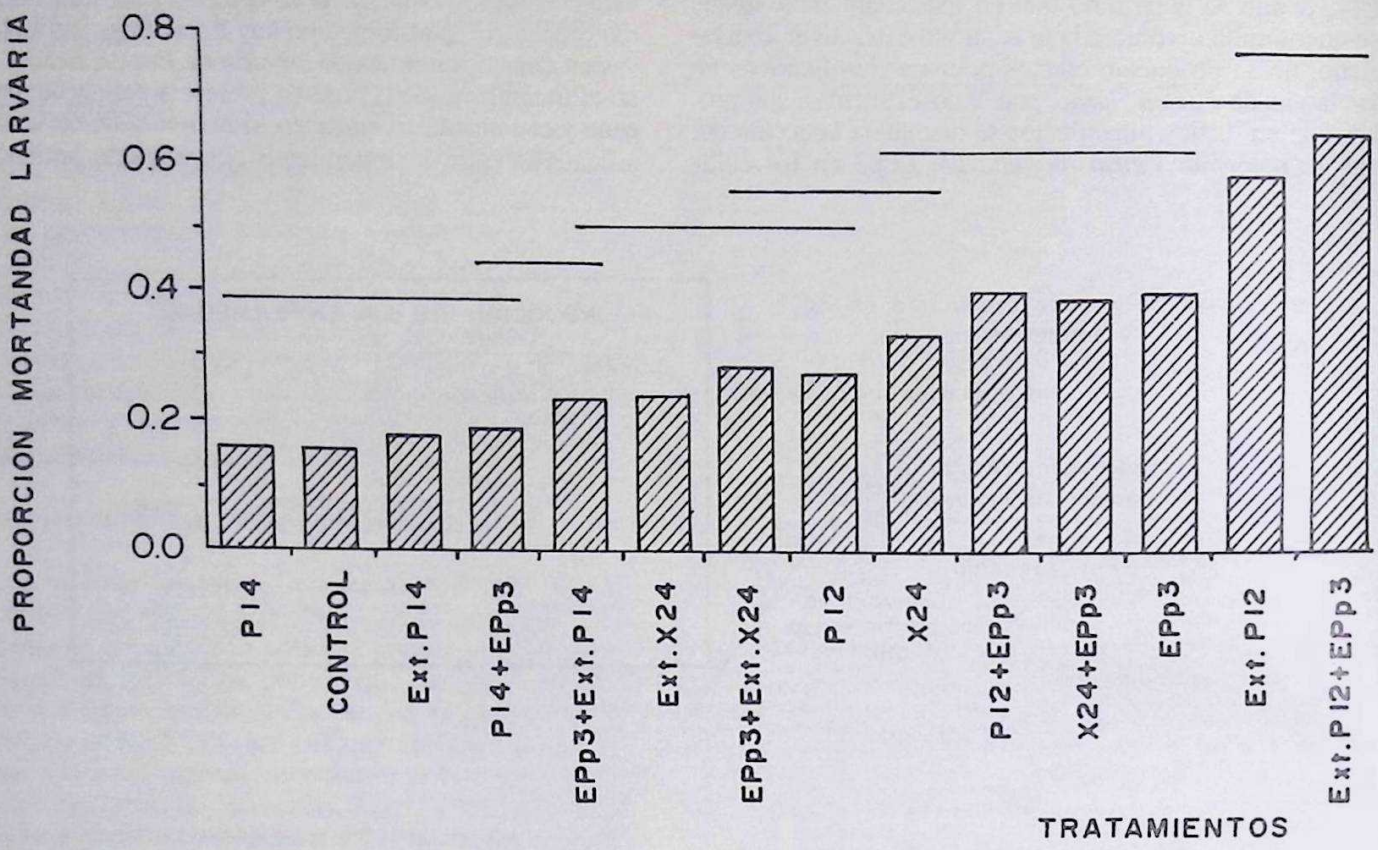


Fig. 2.- Media de la proporción de mortandad larvaria de Pecten ziczac en los diferentes tratamientos. Las líneas horizontales indican la relación significativa ($P \leq 0.005$), según los análisis estadísticos aplicados. P14, x24 y P12 = cepas marinas productoras de sustancias antibacterianas. Ext = Extrato antibiótico. Epp3 = Germen patógeno.

riano de la misma en presencia del agente patógeno y el control (Fig. 2). Todo ello indica que la cepa *Flavobacterium* pudiera ser útil para el biocontrol y prevención de enfermedades bacterianas en larvas de bivalvos marinos. No obstante, el uso de un nuevo antibiótico o bien de una cepa como biocontrol en sistemas de cultivos de organismos acuáticos, debe realizarse después de que estudios repetitivos y a gran escala, muestren resultados altamente satisfactorios.

REFERENCIAS

BAREFOOT, J. F. & T. R. KAENHAMMER. 1983. Detection and activity of lactin B, a bacteriocing procedure by *Lactobacillus acidophylus*. *Apple. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1815.

CONOVER, W. J. 1980. *Non parametric statistics*. Segunda Edición. Wiley & Sons. 493 pp.

DOPAZO, C. P., M. LEMOS, C. LODEIROS, J. BOLINCHES, J. BARJA & E. TORANZO. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 97-101.

LODEIROS, C., I. CAMPOS & N. MARIN. 1988a. Producción de antibióticos por la flora asociada a monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura. *Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle*. (En prensa).

LODEIROS, C., E. FERNANDEZ, A. VELEZ & J. BASTARDO. 1988b. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 27(142): (en prensa).

VELEZ A., E. ALIFA & L. FREITES. 1988. Inducción de la reproducción de la vieira *Pecten ziczac* (Lin-