

ESTUDIO MICROBIOLOGICO DE LA SUPERVIVENCIA Y ESTADO ACTIVO NO CULTIVABLE DE ESPECIES DE LA F. VIBRIONACEAE

Conde Vendrell, Marta.

Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

García Álvarez, Francisco Javier.

Ingeniero Técnico en Industrias Agrarias y Alimentarias.

Sieiro Gallardo, Carmen María.

Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Rodríguez Míguez, Luis.

Doctor en Medicina. Profesor titular de la Universidad de Vigo.

Rodríguez López, Luis. Alfonso.

Doctor en Biología. Profesor titular de la Universidad de Vigo.

RESUMEN

Aeromonas y *Vibrio* son microorganismos asociados al agua, capaces de producir enfermedades en seres humanos tales como gastroenteritis, bacteriemias, o meningitis.

En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo en 2 tipos de agua (de mar y de río) y a dos temperaturas (10°C y 22°C) para evaluar la viabilidad de los microorganismos *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas caviae*. La metodología usada para el recuento de estos géneros bacterianos incluye el uso de un medio de cultivo no selectivo, agar Soja Tryptona (TSA). Asimismo, se ha realizado un estudio del estado activo no cultivable (ANC) una vez que la supervivencia dio cero unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL) en el recuento directo en placa.

Los resultados indican que estos microorganismos permanecen viables a 22°C más de 40 días,

Area de Microbiología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo, Campus de Ourense. Fax: 988387001.

Telf: 988387066.- lalopez@uvigo.es

mientras que a 10°C superan los 314 días, tanto en agua de mar como en agua de río. El estado de ANC ha sido verificado para *Vibrio anguillarum* ATCC 19264 y para *Aeromonas hydrophila* B-51.

Palabras clave: *Vibrio*, *Aeromonas*, agua de mar y de río, dos temperaturas, ANC

RESUMEN

Aeromonas et *Vibrio* sont microorganismes q'on vivent dans l'eau on peuvent produire maladies dans l'homme comme: gastroenteritis, bacteriemia et meningitis.

A cette travail ci on a fait un étude comparative dans des types d'eau (de mer et de rivière) et a des températures, (10°C et 22°C) pour évaluer la viabilité du *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas caviae*. La méthodologie employé pour l'énumération de ces genres bactériens insère l'usage d'un moyen de culture non sélectif Agar Soja Tryptone (TSA). Aussi on a fait un étude de l'état de vivant mais non cultivable (ANC) une fois que l'énumération de la survivance en plaque a été zéro UFC/mL.

Comme résultat, les microorganismes ont été vivant plus de 40 jours a 22°C et plus de 314 jours a 10°C. *Vibrio anguillarum* (ATCC 19264) et *Aeromonas hydrophila* (B-51) à montre l'état de vivant mais non cultivable.

Most cleft: *Vibrio*, *Aeromonas*, eau de mer et de rivière, des températures, ANC

SUMMARY

Aeromonas and *Vibrio* are microorganisms associated with water, and can produce diseases in humans such as gastroenteritis, bacteriemias and pritonitis.

A comparative study at two different waters (sea and fresh water) and two different temperatures

(10°C and 22°C) was made to determine the viability of microorganisms *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas caviae*. The methodology used in the recovery of these pathogens included the use of non-selective plating on Tryptone Soya Agar (TSA). When viable cell counts has reached zero it is studied forms viable but non-culturable cells. Results showed that the microorganisms remain viable more that 40 days at 22°C and more that 314 days at 10°C. *Vibrio anguillarum* (ATCC 19264) and *Aeromonas hydrophila* (B-51) presents dormant state.

Word keys: *Vibrio*, *Aeromonas*, sea and fresh water, two temperatures, ANC

INTRODUCCION

Vibrio y *Aeromonas* son γ -Proteobacterias, incluidos ambos en la súperfamilia I, orden *Vibrionales*, familia *Vibrionaceae* (Krieg, Sneath, Staley. 9; Prescott, Harley y Klein. 14). Son habitantes normales del agua dulce o salada, causando enfermedades e infecciones en animales de sangre fría, y produciendo dolencias en criaturas de sangre caliente, como el ser humano. Estas bacterias se encuentran en sifones de tuberías sanitarias y de desagüe y pueden recuperarse a partir de canillas de agua corriente y suministros de agua destilada, fuentes potenciales de microorganismos involucrados en infecciones hospitalarias (Vivas, Saa, Tinajas, Barbeyto y Rodríguez. 22).

Vibrio puede causar enfermedades diarreicas más o menos graves, además de infecciones extraintestinales que pueden dar como resultado una septicemia letal o disenterías. El vibrión colérico produce una potente enterotoxina que causa la grave enfermedad del cólera. (Davis, Dulbecco, Eisen y Ginsberg. 3). Las vibriosis producidas por *Vibrio anguillarum* en cultivos de peces de mar, son las infecciones más importantes que limitan la producción acuícola y sus epizootias han sido descritas por varios autores (Toranzo y Barja. 18).

Aeromonas ha sido identificada como la causante de varias infecciones humanas, que incluyen bacteriemia, gastroenteritis, meningitis, peritonitis e infecciones bronco-pulmonares (Vivas, Saa, Tinajas, Barbeyto y Rodríguez. 22). Dentro de este grupo, *Aeromonas hydrophila* es un patógeno oportunista, mientras que *Aeromonas salmonicida* causa forunculosis en salmónidos y es considerado un patógeno obligado (Pérez, Fernández, Rodríguez y Nieto. 13). *Aeromonas sobria* está presente en la mayoría de

peces moribundos afectados de epizootias ulcerosas (Frerichs y Hendrie. 6) siendo aislada como patógeno de trucha arcoiris (Toranzo y Barja. 18).

La supervivencia de una bacteria en un ecosistema acuático se define como un estado celular resultante de su presencia en un medio hostil donde depredadores microbianos, insuficiencia de nutrientes, condiciones físicas subóptimas y toxinas ocasionales y biocidas de origen natural, coexisten e interaccionan entre ellos (Bell, Elliot y Smith. 2; Vendrell, Torres, Gil, Vivas y Rodríguez. 19).

De acuerdo con Oliver (12) una especie bacteriana en un estado activo no cultivable se define como una célula que es metabólicamente activa pero que es incapaz de dividirse cuando es mantenida en ciertas condiciones, por lo que no se detecta mediante técnicas microbiológicas de cultivo convencionales aunque siguen siendo patógenas. La primera publicación que mostró la evidencia de este hecho fue realizado por Xu y col. (Xu, Roberts, Singleton, Arwell, Grimes y Colwell. 24). Estos investigadores usaron métodos que no requerían el cultivo de células para demostrar que *Vibrio cholerae* y *E. coli*, seguidos de una incubación en agua salina artificial, permanecían viables aunque perdían la capacidad de dividirse.

Las observaciones básicas son las siguientes: una célula bacteriana cultivable es inoculada en un microcosmos estéril, comúnmente agua de mar o de río, y es incubado un determinado número de días con recuentos regulares. A lo largo del tiempo se observa que el número de células cultivables disminuye (contabilizándolas mediante la técnica de recuento directo en placa), mientras que el número de células totales presentes permanece constante (Vendrell, Gallardo, González, Gallego y Rodríguez. 20). La hipótesis del estado de ANC es que esas células no cultivables no están muertas, sino que se encuentran en un estado activo latente que les permite recuperar su viabilidad si las condiciones del medio donde existen se lo permite (Roszak y Colwell. 17).

Diversos autores (Grimes, Atwell, Brayton, Palmer, Rollins, Roszak, Singleton, Tamplin y Colwell. 7; Munro y Colwell. 11) han puesto de manifiesto en sus trabajos que el número de bacterias entéricas presentes en un ecosistema acuático natural puede ser mucho mayor que el número de bacterias entéricas detectables por métodos de conteo en placa. Así pues, una importante fracción de las bacterias presentes en un entorno acuático pueden mantener algún tipo de actividad metabólica. Además, Grimes y col. (Grimes, Atwell, Brayton, Palmer, Rollins,

Rozsak, Singleton, Tamplin y Colwell. 7) señalan la importancia de esta fracción de bacterias (indetectable por métodos tradicionales de conteo directo) debido a que pueden mantener su infectividad, lo cual constituye un riesgo para la salud humana.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias utilizadas. Para este trabajo se han utilizado 4 cepas de *Aeromonas* de distintas especies (*A. sobria* P337, *A. salmonicida* AL130B, *A. hydrophila* B51 y *A. caviae* P322) además, de 1 cepa de *Vibrio anguillarum* ATCC19264, aisladas de peces (ver **Tabla I**). Las cepas fueron cultivadas en agar soja-trip-ticaseína (Cultimed) a 22°C durante 24 horas y fueron almacenadas en agar nutritivo a 4°C bajo aceite mineral y congeladas a -70°C con un 15% de glicerol.

La identificación de cada cepa aislada fue confirmada de acuerdo con el criterio bioquímico de Koneman (Koneman, Allen, Dowell, Janda, Sommers y Winn. 8).

Agua. Para crear el microcosmos se ha utilizado agua de mar (de la ría de Vigo, Galicia) y de río (del río Miño, Galicia) esterilizadas mediante filtros de celulosa de 0.22µm, de las cuales 10 mL se transfirieron a tubos de cristal estériles.

Preparación del inóculo. Los microorganismos se hicieron crecer en caldo nutritivo (TSB, Cultimed) a 22°C durante 8 horas. Las células en fase exponencial se lavaron por centrifugación (3.000 X g durante 15 minutos) y tras lavar 3 veces con solución salina estéril (0.9% [peso/volumen]), el pellet fue suspendido en solución salina, inoculado en caldo nutritivo fresco e incubado a 22°C durante 18 horas. La suspensión final fue inoculada en los tubos con agua de río y de mar hasta obtener una densidad final aproximada de 10⁷ UFC/mL (por lectura en espectrofotómetro, λ= 610 nm). Posteriormente a la inoculación, cada tubo se incubó a 10°C y 22°C, temperaturas de refrigeración y ambiente. La capacidad de supervivencia a dos temperaturas ha sido estudiada

porque se ha comprobado que en agua de mar (rica en variedad mineral) existe una relación entre la supervivencia y la temperatura del agua (Fernández, Rodríguez y Nieto. 5; Vendrell, Gallardo, Torres, Míguez, Araujo y Rodríguez. 21).

Supervivencia y recuento de los patógenos.

Para determinar la supervivencia de las diferentes cepas se utilizó el método de conteo directo en placa. Durante el experimento, una vez inoculados los tubos, a intervalos de 2 a 10 días se realizaron diluciones seriadas y alícuotas de 0.1 mL fueron sembradas directamente en el medio agar Soja Tripton (agar TSA) con el objeto de obtener un número de colonias entre 30-300 (número aproximado que se considera fiable). Todas las placas fueron incubadas a 22°C durante 24h.

Investigación del estado de ANC. Tras realizar la supervivencia y terminar con conteo cero en las placas de agar después de dos conteos consecutivos, se llevó a cabo el estudio del estado de ANC mediante dos técnicas (Rose, Ellis y Munro. 16):

1. Se vertió 1 mL del agua del tubo del inóculo en 10 mL de caldo Soja Tripton (TSB) y otros tantos en 10 mL de TSB diluido diez veces. Se incubó a una temperatura de 22°C, durante 24 horas. Posteriormente se sembró un inóculo de 0.1mL en placas de TSA y TSA1/10.
2. Se filtraron 2 mL del agua del tubo del inóculo mediante una membrana estéril de celulosa de 0.22 µm. Los filtros se colocaron en placas de TSA y TSA1/10. Se incubaron a 22°C durante 24 horas.

La aparición de colonias en las placas de agar indica que el microorganismo estudiado presenta estado de ANC. Para el conteo se usó el método de recuento directo en placa. Conocido el volumen de la muestra sembrada, es posible expresar el resultado final del recuento en función de un volumen de agua tomado como unidad X colonias para 1 mL, o Y colonias para 100 mL (McCarthy. 10).

Cepa	Origen (peces)
<i>Aeromonas salmonicida</i> (AL130B)	<i>Salmo trutta</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> (B-51)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<i>Aeromonas sobria</i> (P-337)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<i>Aeromonas caviae</i> (P-322)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<i>Vibrio anguillarum</i> (ATCC 19264)	<i>Gadus morhua</i>

Tabla I.- Cepas bacterianas usadas en el experimento.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la supervivencia en agua de mar y agua de río a 22°C y 10°C, se muestran en las **Gráficas 1, 2, 3, 4 y 5**. En ellas se puede observar que existe un comportamiento análogo para *Aeromonas* en todas las cepas estudiadas en los dos tipos de agua. A 10°C el número de UFC/mL sufre un bajón al principio del experimento, a partir del cual comienza a aumentar el número de células manteniéndose más o menos constante hasta los últimos días que comienza de nuevo a descender (a 10°C el metabolismo está más ralentizado y se mantiene mucho más la viabilidad de las células bacterianas). Sin embargo, este comportamiento no se cumple para *Vibrio*: la cepa mantiene una constancia perfecta en el número de

UFC/mL hasta los últimos días del experimento, en que comienza a disminuir.

Se ha comprobado que la viabilidad de las cepas es exactamente igual en agua de río y en agua de mar a 22°C, pues todas cepas estudiadas, tanto las 3 de *Aeromonas* como la de *Vibrio*, dieron contaje cero a los 40 días, a excepción de *A. hydrophila*, que en agua de río llega hasta los 154 días.

Respecto a los resultados obtenidos en el estudio del estado de ANC, se ha determinado éste en todas las cepas puesto que a 22°C todas alcanzaron su fase de muerte durante el experimento. Ha sido verificado este estado para *Vibrio anguillarum* ATCC 19264 y para *Aeromonas hydrophila* B-51.

Figura 1.- Curva de supervivencia de *Aeromonas sobria*.

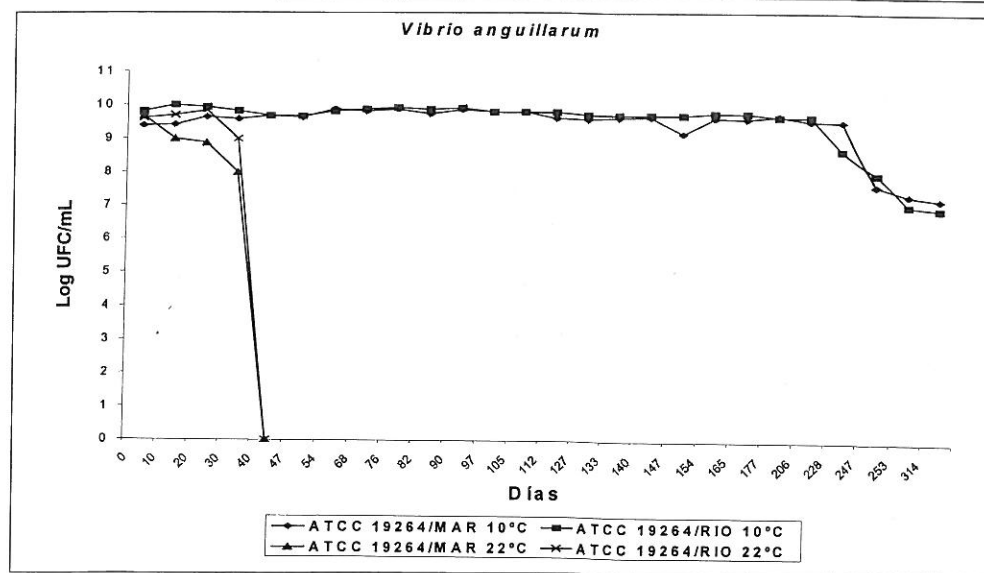
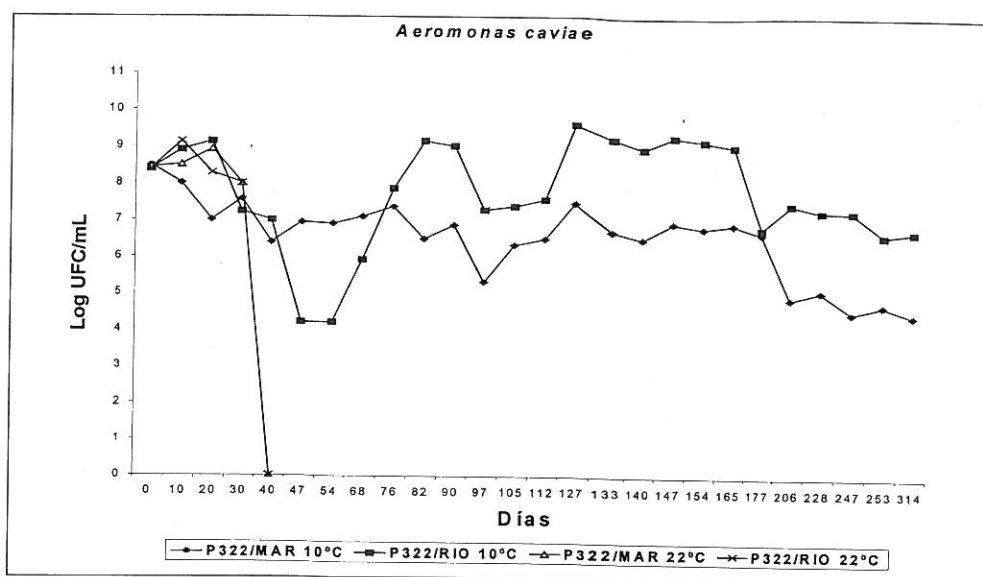


Figura 2.- Curva de supervivencia de *Aeromonas salmonicida*.

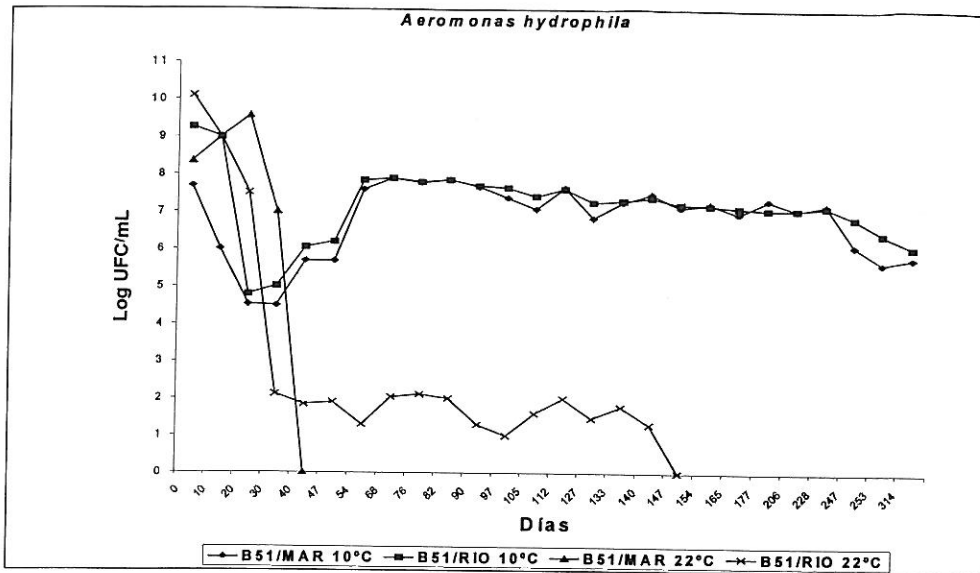


Figura 3.- Curva de supervivencia de *Aeromonas hydrophila*.

Figura 4.- Curva de supervivencia de *Aeromonas caviae*.

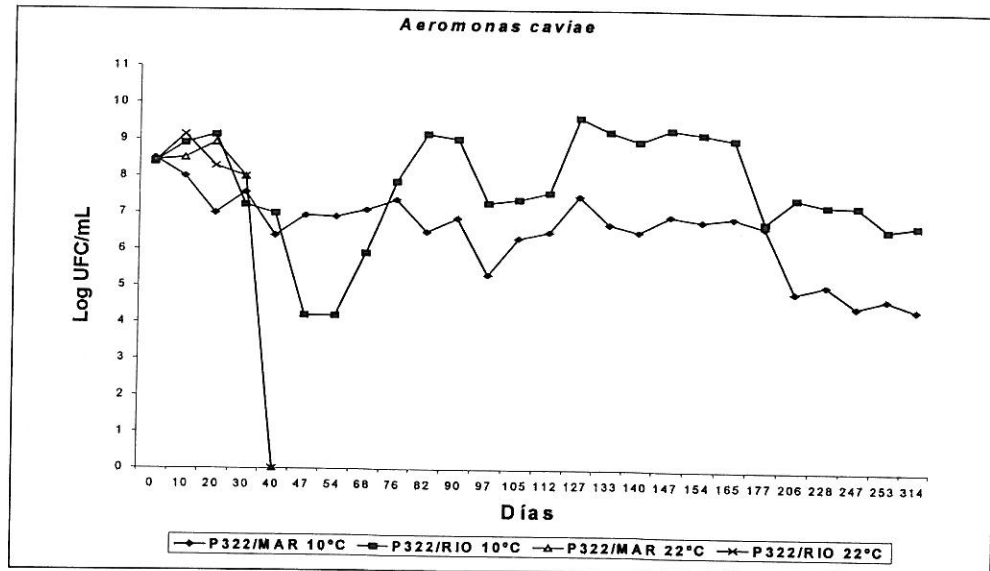
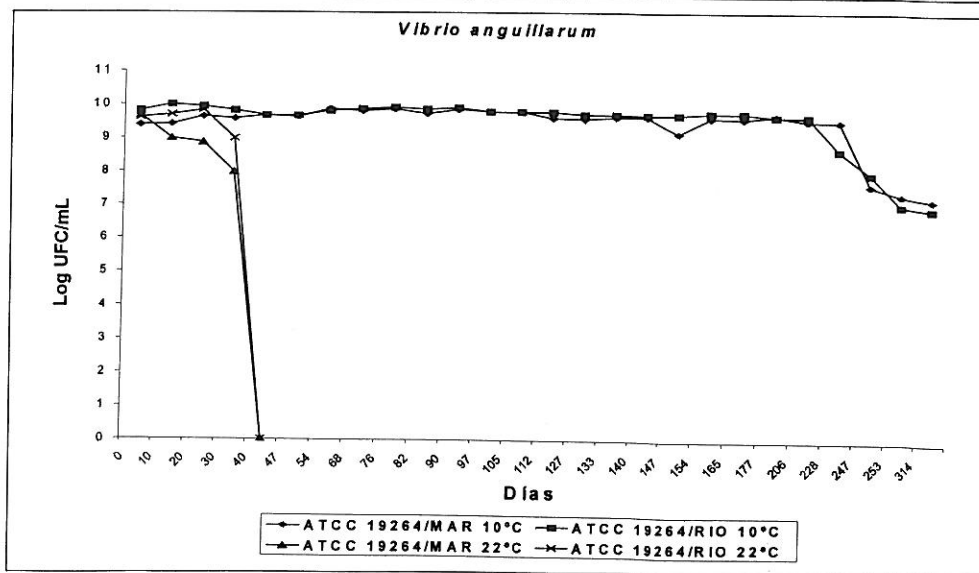


Figura 5.- Curva de supervivencia de *Vibrio anguillarum*.



DISCUSION

Aeromonas y *Vibrio* son microorganismos capaces de sobrevivir y mantenerse viables más de 5 meses tanto en agua de mar como de río, a la temperatura de 10°C, fenómeno justificable porque son microorganismos típicos de agua. *Aeromonas* es capaz de persistir en el medio ambiente durante períodos prolongados, sobre todo en agua de río (*Vibrio* presenta más resistencia en agua de mar) y como ambos presentan estado de ANC pueden volver a proliferar si las condiciones del medio así se lo permiten (alta concentración de nutrientes o temperatura de crecimiento óptima y osmolaridad adecuada), como indican los estudios realizados por varios autores (Barcina, Lebaron y Vives-Rego. 1; Votyakova, Kaprelyants y Kell. 23).

Resultados iguales obtenidos para *Aeromonas*, (Ferguson Glover, McGillivray y Prosser. 4; Pérez, Fernández, Rodríguez y Nieto. 13) llegaron a la conclusión de que este género es capaz de sobrevivir alrededor de 40 días a 22°C y más de 314 días a 10°C,

pero que *Vibrio* (Munro y Colwell. 11) es capaz de mantenerse viable en agua de mar más de 60 días a 22°C, resultado que no se corresponde con el obtenido en este trabajo (la cepa utilizada duró 40 días a 22°C) probablemente debido a variabilidades entre distintas cepas.

Los resultados obtenidos coinciden con los estudios de Ravel y col. (Ravel, Knight, Monahan, Hill y Colwell. 15), que indican que la cepa *Aeromonas salmonicida* no presenta estado de ANC, así como los realizados por Munro y Colwell (11), en los que la cepa *Vibrio cholerae* O1 presenta estado de ANC después de dar conteo cero a los 60 días de su incubación en agua de mar a 25°C.

De esos resultados se deduce que, aunque en un recuento de conteo directo en placa no aparezcan microorganismos, esto no quiere decir que no estén presentes, sino que pueden permanecer en un estado de ANC y que pueden recuperarse y generar enfermedades en individuos si son expuestos al ambiente adecuado para ello.

BIBLIOGRAFIA

1. Barcina, I.; Lebaron, P. y Vives-Rego, J. (1997). Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. **FEMS Microbiology Ecology**. **23**, pp. 1-9.
2. Bell, J. B.; Elliot, G. E. y Smith, D. W. (1983). Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in faecal coliform populations. **Applied and Environmental Microbiology**. **46**, 227-232.
3. Davis, B.; Dulbecco, R.; Eisen, H. y Ginsberg, H. (1996). **Tratado de Microbiología**. Masson S. A. Cap. **24, 25, 27, 29 y 34**.
4. Ferguson, Y.; Glover, L.A.; McGillivray, D.M. y Prosser, J.I. (1995). Survival and activity of lux-marked *Aeromonas salmonicida* in seawater. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**: 3494-3498.
5. Fernández, A.I.G.; Rodríguez, L.A. y Nieto, T.P. (1992). Survival of bacterial fish pathogen in sea water. **Aquaculture**. **107**: 271-276.
6. Frerichs, G.N. y Hendrie, M.S. (1985). Bacteria associated with diseases of fish. In Isolation and Identification of Micro-organisms of Medical and Veterinary Importance. In: **Society for Applied Bacteriology Technical Series** ed. Collins C.H. and Grange J.M., pp. 355-71. Academic Press, London.
7. Grimes, D.J.; Atwell R.W., Brayton P.R., Palmer L.M., Rollins D.M., Roszak D.B., Singlenton F.L., Tamplin, M.L., y Colwell R.R. (1986). The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. **Microbiol. Sci.** **3**: 324-329.
8. Koneman, W., Allen, S., Dowell, V., Janda, W., Sommers, H. y Winn, W., 1990. **Diagnóstico microbiológico**. Ed. Panamericana. 3ª edición.
9. Krieg, N., Sneath, P. y Staley, J., 1993. The genus *Aeromonas*. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ª. (WILLIAMS and WILKINS, Editor). Baltimore.
10. McCarthy, S. A. (1996). Effects of Temperature and Salinity on Survival of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in Seawater. **Microb. Ecol.**, **31**, 167-175.
11. Munro, P. y Colwell, R. (1996). Fate of *Vibrio cholerae* O1 in seawater microcosms. **Wat. Res.**, vol **30**, n° **1**, pp. 47-50.
12. Oliver, J. (1993). Formation of Viable but Nonculturable Cells. En: **Starvation in Bacteria**, ed. Staffan Kjelleberg. Plenum Press, N.Y.
13. Pérez, M.J.; Fernández, A.I.G.; Rodríguez, L.A. y Nieto, T.P. (1995). Importance of the sample size to determine the survival time of *Aeromonas salmonicida*. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.** **15**: 45-48.
14. Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. (1999). **Microbiología**. Ed. McGraw-Hill, Madrid. Cap. **1, 20, 22, 23 y 41**.

15. Ravel, J., Knight, I.T., Monahan, C.E., Hill, R.T., y Colwell, R.R. (1995). Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state: growth or resuscitation?. **Microbiology** 141: 377-383.
16. Rose, A. S.; Ellis, A. E. y Munro, A. L. S. (1990). The survival of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in sea water. **J. Fish Dis.** 13: 205-214.
17. Roszak, D. B. y Colwell, R. R. (1987). Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. **Appl. Environm. Microbio.** 53, 2889-2893.
18. Toranzo, A.E., y Barja, J.L. (1990). A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. **Dis. Aquat. Org.** 9: 73-82.
19. Vendrell, M.C., Torres, M., Gil, P. Vivas, J. y Rodríguez, L.A. (1999) Supervivencia de *Enterococcus* en aguas con distinta composición mineral. **Alimentaria**. pag. 19-21 Oct. 1999.
20. Vendrell, M.C.; Gallardo, C.S.; González, J.A.; Gallego, A.R. y Rodríguez, L.A. (2000) Evaluación de la supervivencia del indicador fecal *Escherichia coli* en distintas aguas mineromedicinales. **Alimentaria**. Núm. 312, pp. 19-22. Mayo 2000.
21. Vendrell, M.C.; Gallardo, C.S.; Torres, M.; Míguez, L. R.; Araujo, P. y Rodríguez, L.A. (1999) Estudio de supervivencia de distintos patógenos en agua termal y agua de río. **Boletín de la Sociedad Española de Hidrología Médica**, Vol. XIV, número 2, pp. 71-81. Mayo, 1999.
22. Vivas, J.; Sáa, A.I.; Tinajas, A.; Barbeyto, L y Rodríguez, L.A. (2000). Identification of motile *Aeromonas* strains with the MicroScan WalkAway System in conjunction with the Combo Negative Type 1S Panels. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 66, No. 4. pp.1764-1766.
23. Votyakova, T.V.; Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B. (1994). Influence of viable cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3284-3291.
24. Xu, H. S.; Roberts, N.; Singleton, F.L.; Atwell, R.W.; Grimes, D.J. y Colwell, R.R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environments. **Microbiol. Ecology**, 8, 313-323.

BALNEARIO DE LUGO - HOTEL TERMAS ROMANAS

Aguas Bicarbonatadas, Sulfuradas Mixtas, Hipertermales (43,8º)

TRATAMIENTOS: Reumatismos crónicos (Artrosis, Artritis) • Reumatismos no articulares (Ciáticas, Lumbalgias) • Afecciones Respiratorias (Faringitis, Rinitis, Sinusitis, Laringitis, Bronquitis) • Enfermedades dermatológicas • Aparato digestivo.

TECNICAS: Baños, Chorros, Hidromasajes, Baños de Burbujas • Duchas Circulares, Parafangos, Masajes • Pulverizaciones, Inhalaciones, Nebulizaciones • Duchas Nasales, Aerosoles.

Situado en Lugo dispone de hotel con 40 habitaciones con cuarto de baño, calefacción, hilo musical, televisión. Amplio aparcamiento, 6.000 m² de zona ajardinada, con embarcadero propio y un paseo peatonal de 2 kilómetros al lado del río.

Barrio del Puente, s/n • 27004 LUGO • Teléfono (982) 22 12 28 - Fax (982) 22 16 59

ABIERTO TODO EL AÑO. Reservas con una antelación mínima de 15 días.

