

Determinación cuantitativa de microorganismos del género *Vibrio* durante el desarrollo embrionario y larval de la almeja *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae), bajo condiciones de laboratorio

Gloriana Andrade Jiménez¹⁻², Marynés Montiel de Morales¹,
Yajaira García de Severeyn^{2*}, Héctor Severeyn³ y Félix Morales³

¹Lab. de Microbiología Ambiental de Bacterias. ²Lab. de Cultivo de Invertebrados Acuáticos.

³Lab. de Sistemática de Invertebrados Acuáticos. Departamento de Biología, Facultad Exp. de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 20-11-97. Aceptado: 15-05-00

Resumen

En la mayoría de los reportes científicos sobre microorganismos asociados al cultivo de bivalvos, se relaciona la presencia de bacterias del género *Vibrio* con mortandades masivas a nivel larvario. El presente estudio tuvo como finalidad evaluar cuantitativamente la presencia de microorganismos del género *Vibrio* en las diferentes etapas del desarrollo embrionario y larval de *Tivela mactroides*, en sistema cerrado. Las almejas adultas fueron recolectadas en la playa de Caño Sagua, aclimatadas, desovadas y cultivadas bajo condiciones de laboratorio. Se evaluaron cinco desoves masivos. En un acuario estéril, se colocó de forma aséptica 1 L de solución de desove y 3 L de agua (previamente filtrada e irradiada con luz ultravioleta). Se tomaron muestras de agua, de alimento y de larvas durante los estadios de desarrollo. El recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del género *Vibrio* se realizó en agar-tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) siguiendo la técnica de siembra en superficie de agar. Los valores más altos de UFC mL⁻¹ de *Vibrio* se observaron en el desove masivo ($5,0 \times 10^3$) y en el estadio de blástula móvil ($7,2 \times 10^3$). En la muestra de agua de inicio así como en el cultivo algal de *Isochrysis galbana* los recuentos fueron bajos, lo cual indica que no constituyen una fuente importante de *Vibrio*, bajo estas condiciones. Los resultados sugieren que la presencia de microorganismos del género *Vibrio* durante el desarrollo del cultivo de *T. mactroides*, debe siempre ser monitoreada ya que puede estar relacionada con las mortandades masivas de larvas que han sido observadas en los cultivos de esta especie en el laboratorio.

Palabras clave: Almeja; Bivalvia; cuantificación; Veneridae, *Vibrio*.

Quantification of microorganisms of the genus *Vibrio* present during the embryonic and larval cycle of *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae), under laboratory conditions

Abstract

Most reports about microorganisms associated to bivalve cultures, relate the presence of bacteria of the genus *Vibrio* with massive mortalities of larvae. This study had the goal of evalu-

* Autor para la correspondencia. Fax (061) 577228. E-mail: ysevereyn@solidos.ciens.luz.ve.

ating, quantitatively, the presence of *Vibrio* bacteria during the embryonic and larval development of the clam *T. mactroides*. Adult clams were collected in Caño Sagua Beach. Then, they were acclimated, spawned and cultivated under laboratory conditions. Five spawning events were evaluated. A liter of spawning solution, taken aseptically, was mixed with three liters of previously treated water (filtered and U.V radiated) in a sterile aquarium. During assays there were taken samples of water, food and stages of development. The quantification of *Vibrio* was done using the UFC mL⁻¹ recounting by growing on surface agar TCBS technique. The highest values of UFC mL⁻¹ were detected during blastula stage (7.2×10^3) and spawning (5.0×10^3). In samples of water initiating essays, values were predominantly low, as were those of *Isochrysis galbana* algal culture. This low counting in algal cultures reveal that they are not a major source of *Vibrio* bacteria. Results suggest that the presence of *Vibrio* bacteria during the culture of *T. mactroides* must be always monitored because it could be the source of massive larval mortalities sometimes observed in laboratory assays.

Key words: Bivalve; clams; quantification; Veneridae; *Vibrio*.

Introducción

El cultivo de los moluscos bivalvos bajo condiciones controladas crea con frecuencia condiciones adecuadas para la proliferación de gran cantidad de bacterias, debido a la utilización de cultivos algales como alimento, a la deposición orgánica y a las condiciones térmicas establecidas para el desove, mantenimiento y desarrollo de los mismos (1, 2).

Algunos investigadores (2-6) han demostrado que durante el cultivo y desarrollo de los bivalvos se presentan una serie de enfermedades las cuales han sido asociadas a la presencia de microorganismos.

Con frecuencia las bacterias del género *Vibrio* son consideradas como responsables de estos eventos (1, 2) y en varias ocasiones han sido la causa de desastres en los cultivos de bivalvos (7). Se ha reportado en larvas de *Crassostrea gigas* que *Vibrio* sp. constituyó entre el 60 y el 95% de las bacterias aisladas (8).

La presencia de bacterias del género *Vibrio* ha sido asociada a diversas fuentes, especialmente a el agua, el bivalvo adulto y/o los cultivos microalgales utilizados como alimentos (2, 8). Estudios previos (8) sugieren que la presencia de *Vibrio splendidus* II en los progenitores, especialmente en las gó-

nadas, podrían indicar que los progenitores podrían ser la fuente y la ruta de transmisión del patógeno.

El presente estudio tuvo como finalidad, cuantificar y determinar el origen de los microorganismos del género *Vibrio* presentes en el cultivo de *Tivela mactroides* durante el desarrollo embrionario y larval, bajo condiciones de laboratorio.

Materiales y Métodos

Ubicación del área de captura de los animales

Tivela mactroides se desarrolla en la playa Caño Sagua, ubicada en la región nor-occidental del Golfo de Venezuela, en la Ensenada de Calabozo, en las coordenadas geográficas: 11° 17' N y 71° 55' O. La superficie aproximada es de 5 Km de costa (Figura 1). La playa se caracteriza por ser una zona de poco desarrollo poblacional y turístico y no presenta actividad industrial. *T. mactroides* vive en la zona submareal, en una franja de aproximadamente 20 m de longitud, paralela a la costa.

Recolección de los especímenes

Las almejas adultas fueron capturadas en forma manual, o con una rastra artesana-

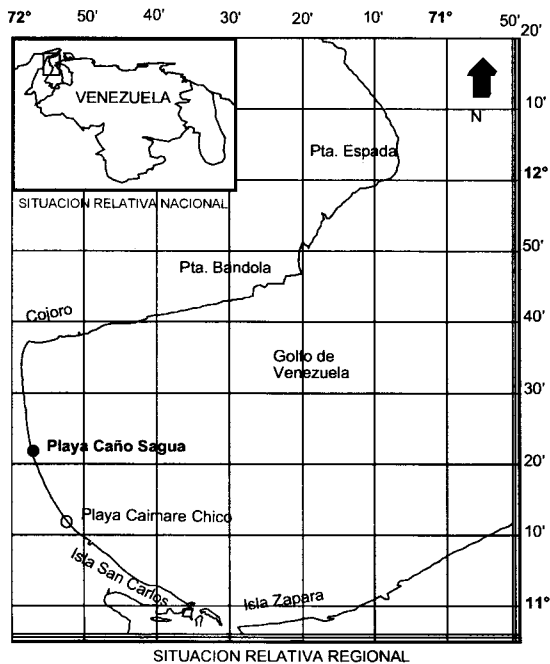


Figura 1. Ubicación geográfica de la Playa Caño Sagua.

nal como la utilizada por los pescadores de la zona, modificada tanto para la captura de animales grandes como pequeños. Luego se seleccionaron de 50 a 60 almejas entre 35 - 40 mm de longitud, las cuales se limpiaron con un cepillo para eliminar el lodo y el detritus de la concha.

Las almejas se distribuyeron en envases plásticos, con agua (previamente filtrada) del sitio de colección, esto con la finalidad de evitar en lo posible el estrés y por consiguiente el desove masivo, durante el traslado al laboratorio.

En cada muestreo, la temperatura del agua y la salinidad fueron medidas utilizando un termómetro de mercurio de 0,1°C de precisión y un salinómetro refractómetro (Americal Optical Corporation), respectivamente.

Cultivo de los estadios embrionarios y larvales

Una vez que los ejemplares llegaban al laboratorio eran aclimatados y distribuidos

en acuarios de 5 L, colocando de 20 a 25 almejas por acuario en espera del desove. Una vez obtenido el desove, ya fuera por inducción (ensayos 3, 4 y 5) (9) o espontáneo (ensayos 1 y 2), se tomó 1 L de la solución de desove, se limpió pasándola a través de un tamiz de 140 μm , si contenía muchas heces, y se adicionó en 3 L de agua de mar.

Al alcanzar las larvas el estadio de prodisoconcha, el cultivo fue limpiado cada dos o tres días (dependiendo si se observaba mucha materia orgánica acumulada); para ello se utilizó una batería de tamices (140, 120, 100, 90, 80, 45 y 20 μm) cuya abertura de malla aumentaba a medida que iban creciendo las larvas. Esto permitió separar o eliminar en función del tamaño, desechos y microorganismos (protozoarios) que eran más grandes que las larvas y que entorpecían el crecimiento de las mismas.

Una vez alcanzada la etapa de larva prodisoconcha, los cultivos fueron alimentados con cultivos puros de *Isochrysis galbana* (1, 5).

El agua utilizada para los cultivos de la almeja en sistema cerrado procedió de la playa Caño Sagua (primer ensayo); de la playa Quisiro (segundo, tercer y quinto ensayo); y de la playa El Supí, Edo. Falcón (cuarto ensayo). No se utilizó el agua de la Playa Caño Sagua en todos los ensayos, debido a que la salinidad del agua de ésta varió y en muchas ocasiones se encontró muy por debajo de 29‰. Al momento de iniciar el cultivo la salinidad era ajustada a 29‰ y la temperatura entre 23-25°C. El agua fue previamente limpiada con filtros de tela o papel Whatman para eliminar desechos y detritus e irradiada con luz ultravioleta, con la finalidad de disminuir el número de bacterias procedentes del agua (1). En cada uno de los tipos de muestras estudiadas (Tabla 1) se tomaron asépticamente 70 mL en botellas estériles de 100 mL de capacidad con una pipeta estéril y luego se procedía a iniciar el análisis microbiológico respectivo.

Tabla 1
Muestras analizadas durante el desarrollo del cultivo larval de *Tivela mactroides*

Nº de muestras	Tipo de muestras	Características
1	Agua de inicio	Agua utilizada para el cultivo.
2	Desove masivo	Desove de las almejas adultas en el acuario.
3	Blástula móvil	Fase del desarrollo embrionario.
4	Trocófora	Primer estadio larval.
5	Prodisoconcha	Segundo estadio larval.
6, 9, 11, 14, 16, 18, 20 23	Alimento algal	Cultivos puros de la especie algal <i>Isochrysis galbana</i> , utilizada para alimentar las larvas.
7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 24, 25.	Cultivo antes del recambio	Cultivo larval más cultivo algal antes de realizar la limpieza.

Tabla 2
Densidad de bacterias del género *Vibrio* (UFC mL⁻¹) aisladas a partir de las diferentes etapas del cultivo larval de *Tivela mactroides*

Tipo de muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
Agua de inicio	2,4 x 10 ³	0	0	2,0 x 10 ¹	3,4 x 10 ³
Desove masivo	5,0 x 10 ³	3,0 x 10 ³	1,9 x 10 ³	3,7 x 10 ³	3,8 x 10 ³
Blástula móvil	2,9 x 10 ³	2,4 x 10 ²	2,7 x 10 ²	7,2 x 10 ³	0
Trocófora	8,7 x 10 ²	-	2,7 x 10 ²	2,0 x 10 ¹	2,2 x 10 ³
Prodisoconcha	2,0 x 10 ¹	-	4,8 x 10 ¹	3,0 x 10 ¹	2,4 x 10 ³

-: no determinado.

Análisis microbiológico

El recuento total se realizó por duplicado utilizando la metodología clásica de recuento en placa por siembra en superficie (10). Esta técnica se aplicó a cada una de las muestras con diluciones desde 10⁰ hasta 10⁻⁶. Los recuentos fueron realizados en el medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), debido al carácter selectivo de este medio para las bacterias del género *Vibrio*.

Resultados y Discusión

Valores altos de *Vibrio* en algunas etapas de los cultivos, han sido consecuentemente reportados por varios investigadores

en aguas dedicadas al cultivo y sistemas de cultivos de bivalvos (8, 10-14).

Durante el desarrollo de los cultivos larvales de *Tivela mactroides*, el valor máximo de UFC mL⁻¹ de *Vibrio* encontrado fue de 7,2 x 10³ y el mínimo de 0 (Tablas 2 y 3).

En el 60% de las muestras de agua utilizadas para el cultivo larval se observaron valores de UFC mL⁻¹ de *Vibrio* menores de 2,0 x 10¹. El 40% restante de las muestras presentaron valores de UFC mL⁻¹ elevados (>2 x 10³) comparados con los reportados por otros investigadores, quienes han encontrado en la muestra de agua utilizada para el cultivo larval de distintos bivalvos, valores de UFC mL⁻¹ entre 4,0 x 10¹ a 3,6 x

Tabla 3

Densidad de bacterias del género *Vibrio* (UFC mL⁻¹) aisladas a partir de cultivos larvales de *Tivela mactroides* durante la fase de alimentación algal y recambio de agua

Tipo de muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
Alimento algal	0	-	5 x 10 ⁰	2,0 x 10 ¹	0
Cultivo antes del 1 ^{er} recambio	-	-	2,4 x 10 ³	0	5,0 x 10 ²
Cultivo antes del 2 ^{do} recambio	-	-	1,8 x 10 ³	0	0
Alimento algal	-	-	1,0 x 10 ¹	-	-
Cultivo antes del 3 ^{er} recambio	-	-	1,0 x 10 ²	0	0
Alimento algal	-	-	-	0	0
Cultivo antes del 4 ^{to} recambio	-	-	1,7 x 10 ²	0	1 x 10 ⁰
Cultivo antes del 5 ^{to} recambio	-	-	0	0	0
Alimento algal	-	-	0	-	-
Cultivo antes del 6 ^{to} recambio	-	-	3,0 x 10 ¹	0	0
Alimento algal	-	-	-	-	0
Cultivo antes del 7 ^{mo} recambio	-	-	1,1 x 10 ²	0	1,5 x 10 ⁰
Alimento algal	-	-	3,0 x 10 ¹	-	0
Cultivo antes del 8 ^{vo} recambio	-	-	2,5 x 10 ¹	5,0 x 10 ¹	3,8 x 10 ²
Alimento algal	-	-	-	0	0
Cultivo antes del 9 ^{no} recambio	-	-	-	1,0 x 10 ¹	0
Cultivo antes del 10 ^{mo} recambio	-	-	-	0	1 x 10 ⁰
Alimento algal	-	-	-	0	-
Cultivo antes del 11 ^{ro} recambio	-	-	-	1,0 x 10 ¹	-
Cultivo antes del 12 ^{do} recambio	-	-	-	0	-

-: no determinado.

10², en muestras de agua tratada (filtrada) (15), de 2,3 x 10² a 5,3 x 10² en muestras de agua de mar tratada (previamente filtrada e irradiada con luz U. V) (1) y de 0 y 1,8 x 10² en muestras de agua tratada y no tratada, respectivamente (5).

Se ha demostrado que los procesos de filtración e irradiación aplicados al agua son conocidos como tratamientos capaces de disminuir la carga bacteriana presente en el agua de mar (10, 16, 17). Estudios previos han demostrado que el tratamiento con U.V. aumenta la sobrevivencia y crecimiento de las larvas de bivalvos, al disminuir el número

de bacterias presentes en el agua de inicio de los cultivos (1, 18).

La variabilidad en relación a las cantidades de *Vibrio* detectadas en el agua de inicio puede estar asociada al sitio de recolección del agua, así como a la carga orgánica que el agua pueda contener "para el momento de la recolección". Se ha demostrado que la efectividad de los tratamientos aplicados al agua, depende del contenido orgánico y de la riqueza de nutrientes encontrada durante determinadas épocas del año en el agua, así como de la incidencia de las bacterias presentes en el medio ambiente marino (1, 2,

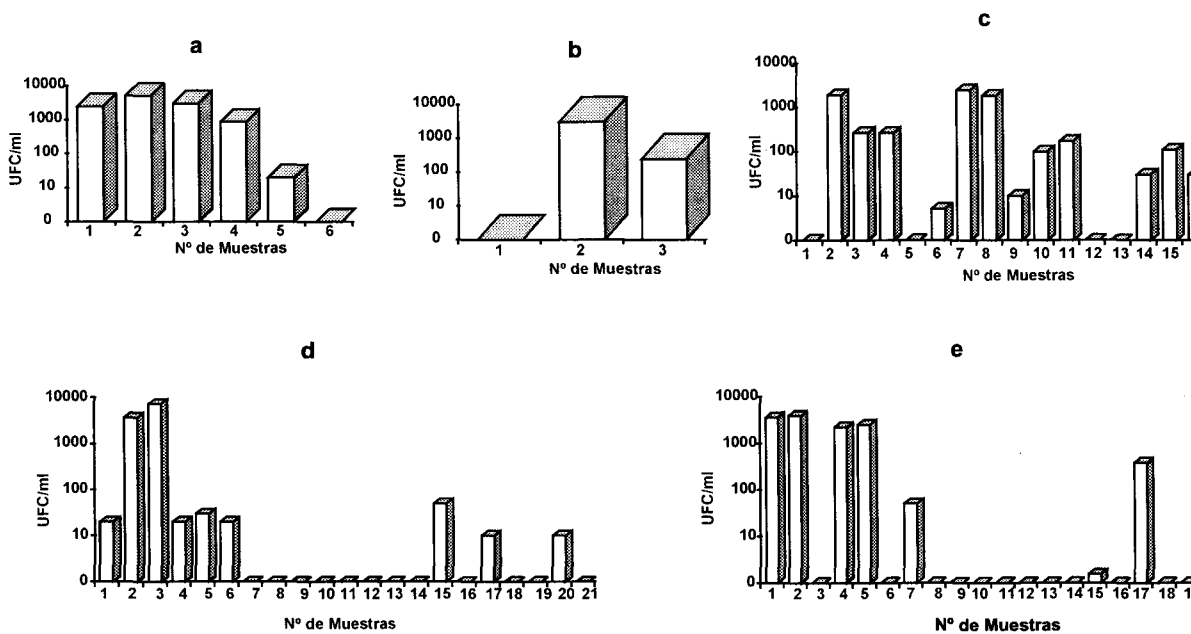


Figura 2. Valores promedios de UFC mL⁻¹ de *Vibrio* en las diferentes etapas del cultivo larval de *Tivela mactroides*, en condiciones de laboratorio. a: ensayo 1, b: ensayo 2, c: ensayo 3, d: ensayo 4, e: ensayo 5.

10, 19). Valores altos de microorganismos pueden interferir en el tratamiento y hacerlo inadecuado.

La Figura 2 muestra los valores promedios encontrados en los diferentes ensayos en cada una de las muestras analizadas. Las muestras de agua recolectadas durante los desoves presentaron un aumento considerable de *Vibrio*, hecho que coincide con lo reportado en un estudio realizado al bivalvo *Ostrea edulis* (8). Estudios previos (1, 3, 10) han relacionado la alta cantidad de bacterias del género *Vibrio* encontradas en el momento de la puesta con la expulsión de estas bacterias durante el desove.

En general se observa que desde la muestra de blástula móvil hasta la de prodisoconcha, los valores UFC mL⁻¹ de *Vibrio* disminuyen notablemente. La excepción a estos ocurrió en dos oportunidades; una donde la cantidad de *Vibrio* para la muestra de blástula móvil fue más elevada que todas las muestras del ensayo y otra donde se ob-

servó un aumento en las cantidades de *Vibrio* desde trocófora hasta la larva prodisoconcha.

La reducción bacteriana posterior al desove, podría estar asociada a la liberación de alguna sustancia bactericida al mezclarse los gametos. Estudios preliminares realizados en el laboratorio sobre esta especie de bivalvo (*T. mactroides*) demostraron que el desove de la hembra, aportaba mayor cantidad de bacterias que el desove del macho, pero al mezclarse los gametos se observó una reducción en el número bacteriano (20).

La disminución de los conteos bacterianos posteriores al desove ha sido asociada en algunas especies, a la expulsión de sustancias con efecto antibacterial durante el desove del macho que permiten disminuir la carga bacteriana existente en el cultivo con el fin de garantizar la viabilidad de estos gametos (7, 21). En nuestro experimento dicha reducción podría estar también relacionada con la dilución realizada (1 L de la so-

lución del desove en 3 L de agua de mar), al momento de iniciar el cultivo larval.

La alta cantidad de bacterias encontrada ($7,2 \times 10^3$) en la muestra de blástula móvil del ensayo 4, se le puede atribuir a que en esta muestra no todos los óvulos fueron viables o fecundados. En este desove hubo óvulos "anormales" de menor tamaño que no completaron el desarrollo embrionario y por consiguiente precipitaron, formando al descomponerse un sustrato adecuado para la proliferación de este tipo de bacterias (2).

En las muestras del cultivo algal de *Isochrysis galbana* se encontraron valores de UFC mL⁻¹ *Vibrio* reducidos y ausentes en su mayoría (Tabla 3), demostrándose que el cultivo de esta microalga no constituye un aporte importante de *Vibrio* (bajo condiciones del laboratorio); estos resultados coinciden con los reportados en la literatura por otros autores (1, 2, 5). Efectos antibacterianos han sido también reportados en muchas clases de algas, demostrándose que ciertos compuestos de las algas pueden inducir lisis en protoplastos bacterianos. Algunos autores (22) han demostrado la actividad antibacteriana de *Skeletonema costatum* sobre varias especies de *Vibrio*. Sería posible pensar que *I. galbana* pudiera ejercer un efecto antibacteriano sobre *Vibrio* y no permitir su crecimiento en los cultivos.

En las muestras del cultivo larval antes de cada recambio se observa que a medida que transcurre el tiempo las cantidades de *Vibrio* se van reduciendo (Figura 2). Se han demostrado que la renovación periódica del agua en los cultivos de bivalvos limita y reduce la proliferación bacteriana (15). Dicha reducción también ha sido relacionada con el agotamiento de los nutrientes existentes en el cultivo larval (1, 23) y a la producción de sustancias antibacterianas en el cultivo de microalgas que al mezclarse con el cultivo de larvas producen un efecto antibacteriano potenciado, reduciendo así el número de bacterias (7, 24, 25).

Sin embargo en las muestras de cultivo antes del 8vo recambio de los ensayos 4 y 5, que contenían larvas más cultivo de algas, se observó un incremento de las UFC mL⁻¹ de *Vibrio* (Tabla 3). Esta proliferación de bacterias se ha atribuido a la concentración de materia orgánica (restos de alimento algal) acumulada a esta altura del cultivo larval. Este exceso de materia orgánica forma un sustrato adecuado para el crecimiento de *Vibrio* (2). Posteriormente, se observa que estas cantidades de *Vibrio* disminuyen, posiblemente debido a los recambios de agua realizados.

Conclusiones

Las bajas cantidades de *Vibrio* encontradas en un alto porcentaje de muestra de agua de inicio y en los cultivos algales de *Isochrysis galbana*, demuestra que el agua y el alimento utilizado en este ensayo para el cultivo larval de *Tivela mactroides* no constituye una fuente importante de estas bacterias.

El mayor aporte de bacterias del género *Vibrio* en el cultivo de *T. mactroides* se encontró en la etapa del desove masivo, el cual podría estar asociado a las bacterias expulsadas durante el momento del desove.

Tal como ha sido señalado por algunos autores (26), un prerrequisito para el desarrollo de una estrategia de control microbiológico es conocer los aspectos, tanto cualitativos como cuantitativos, de la microflora del agua, lá asociada a las larvas y la interacción entre ambas. Los problemas microbiológicos a menudo se originan en etapas tempranas del cultivo larval debido que durante esta fase se incluyen estadios que se someten a períodos con poco o ningún recambio de agua. Hacia esta área deben orientarse futuras investigaciones.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) por el financiamiento parcial de este trabajo a través del programa N° 0631-96.

Referencias Bibliográficas

1. LODEIROS C.J. *Act Cient Ven* 39: 249-256, 1988.
2. FREITES L., LODEIROS C., VÉLEZ A., BASTARDO J. *Carib J Sc* 29(1-2): 89-98, 1993.
3. BROWN C., LOSEE L. *J Inv Path* 31: 41-47, 1978.
4. LODEIROS C., FREITES L., VELÉZ A. *Act Cient Ven* 43: 154-158, 1992.
5. LODEIROS C., BOLINCHES J., DOPASO C.P., TORANZO A.E. *Aquaculture* 65:15-29, 1987.
6. TUBIASH H.S., CHANLEY P.E., LEIFSON E. *J Bact* 90(4):1036-1044, 1965.
7. BAUTISTA C. *Moluscos: Tecnología de cultivo*, Mundi-Prensa, Madrid (España), pp. 167, 1989.
8. SUGUMAR G., NAKAI T., HIRATA Y., MATSUBARA D., MUROGA K. *Dis Aquat Org* 33(2):11-118, 1998.
9. LOOSANOFF V., DAVIS H. *Adv Mar Biol* 1: 1-136, 1963.
10. American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods*, USA, pp. 371-917, 1992.
11. PLUSQUELLEC A., BEUCHER M., PRIEUR D., LE GAL Y. *J Shellf Res* 9(1): 95-101, 1990.
12. KAYSNER C.A., ABEYTA C., WEKELL M., DePAOLA A., STOTT R., LEITCH J. *Appl Env Micr* 53: 1349-1351, 1987.
13. JAWETZ E., MELNICK J., ADELBERG E. *Microbiología Médica*, 14ª. ed., El manual moderno, S.A. de C.V. México, pp. 225-250, 1992.
14. LÓPEZ Y.M., GUZMAN M., MAGALLÓN B.F., VARGAS A.F. *Memorias del V Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar*, La Paz, México, pp. 45, 1994.
15. JEANTHON C., PRIEUR D., COCHARD J.C. *Aquaculture* 71: 1-8, 1988.
16. WAUGH G.D. *Nature* 181: 1747, 1958.
17. WALNE P.R. *J Mar Biol Ass UK* 37: 415-425, 1958.
18. BROWN C., TETTELBACH L.P. *Aquaculture* 74: 195-204, 1988.
19. MUCHERLANO R.A., BROWN C., BISHOP J. *J Fish Res B Can* 32(6): 739-745, 1975.
20. ANDRADE G., MONTIEL M., GARCIA DE SEVEREYN Y. Resultados no publicados.
21. BALINKY B.I., FABIAN B.C. *Introducción a la Embriología*, Ediciones Omega, España, pp. 727, 1983.
22. NAVIDER M., BERGE J., DURAND P., LEBRISH. *Aquaculture* 174: 15-24, 1999.
23. FREDRICKSON A.G., STEPHANOPOULUS G. *Science* 213: 972-979, 1981.
24. SIEBURTH J.M., BOOKS R.D., GESSERN R.V., THOMAS C.D., TOOTLE J.T. *Effect of the ocean environment on microbial activities*, University Park Press, Baltimore (USA), pp. 418-432, 1974.
25. SOLIE M. *Act Adriat* 29 (1/2): 83-104, 1988.
26. SKJERMØ J., VADSTEIN O. *Aquaculture* 177: 333-343, 1999.