

Bacterias en la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Pectinidae)

Bacteria in the hemolymph of *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819)
(Bivalvia: Pectinidae)

Patricio García-Tello, Víctor Ardiles y José L. Fajardo

Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas, Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4059- Valparaíso, Chile.
pgarciat@ucv.cl

Abstract.- Twenty three strains of bacteria were isolated from the hemolymph of *Argopecten purpuratus*. Our results point out to the predominance of asporogenous

Gram-negative rods. We suggest that the presence of these bacteria in the hemolymph is a natural phenomenon.

Key words: bacteria, Mollusca, hemolymph

Introducción

Los cultivos de ostiones (*Argopecten purpuratus*) se han desarrollado considerablemente en el país y representan una importante fuente económica para diferentes acuicultores. Estos cultivos son atacados por microorganismos patógenos de diferentes grupos, tales como protozoos (Sellers 2002)¹ dinoflagelados y bacterias (Carnegie *et al.* 1999; Messick *et al.* 1999; Rivera *et al.* 1999). Las patologías causadas pueden aparecer en cualquier etapa del desarrollo del cultivo, adulto o larval. Otros sugieren una convivencia entre el molusco y ciertas bacterias (Harris-Young *et al.* 1993).

Los estados larvales son susceptible a la infección vertical con bacterias, es decir, desde los órganos reproductores (Chávez & Riquelme 1994). Al parecer la adquisición de una flora bacteriana a nivel de la hemolinfa de invertebrados sería posible fácilmente desde el medio acuático (Brady & De la Vega 1990; Brady & De la Vega 1992).

Es importante destacar que también en la hemolinfa conviven sin causar aparentes patologías ciertas bacterias (Costa *et al.* 1998), las cuales están allí como potenciales patógenos. Estas bacterias están en la hemolinfa, no obstante conocerse que, en algunos invertebrados, por ejemplo, *Crassostrea virginica*, esta contiene enzimas tipo lisozimas que sirven como un mecanismo de defensa interno (Mc Dade & Tripp 1967;

Vincent & Rodrick 2002²). Si bien Riquelme *et al.* (1995), entregan una lista de bacterias presentes en el ostión, su análisis no menciona bacterias en la hemolinfa. En el presente trabajo pretendemos señalar que ya en los ostiones adultos existen bacterias no sólo en sus gónadas sino que también en la hemolinfa.

Materiales y Métodos

Del músculo aductor de 3 ejemplares activos de *A. purpuratus* provenientes de linternas en acuacultivo de Pesquera San José en Tongoy (Chile) se obtuvieron aproximadamente 3 mL de hemolinfa por medio de una jeringa estéril (Terumo). La superficie del músculo fue esterilizada con alcohol antes de obtener la muestra. A partir de esta extracción se sembraron 0,3 mL de hemolinfa, en placas Petri que contenían Agar Marino ZoBell 2216 y que fueron incubadas a 25°C por 7 días. Al cabo de este tiempo se aislaron al azar 23 colonias que fueron purificadas por sucesivos trasposos en el mismo medio de cultivo. Luego las cepas se sometieron a diferentes pruebas para conocer su:

- 1) Tinción de Gram y morfología (Tortora *et al.* 1986)
- 2) Reacción a la tetrafenil-para-fenilen-di-amina hidroclicida para determinar la presencia de la enzima citocromo oxidasa

¹ Sellers CL. 2002. Rehabilitation of the Bay (Literally!) through the oyster. Empiricist- Feature Science Articles <http://biology.nebrwesleyan.edu/empiricist/Research/Ecology/Sellers,Clay/Sellers96.html> (Consulta: 15 agosto 2002)

² Vincent N & G Rodrick G. 2002. *Micrococcus lysodeikticus* sensitive to lysozime treatment from the hemolymph of the American oyster *Crassostrea virginica*. Journal of Undergraduate Research, University of Florida. <http://web.clas.ufl.edu/CLAS/jur/vincentpaper.html> (Consulta: 15 agosto 2002)

- 3) Característica de crecimiento a 25°C por 3 días en medio TCBS (Oxoid) para la aislación de bacterias del género *Vibrio*
- 4) Característica de crecimiento a 25°C por 7 días en medio Hugh-Leifson con glucosa para la reacción de oxidación o fermentación.

Resultados y Discusión

Los resultados expuestos en la Tabla 1 señalan las morfologías bacterianas de bacillus, cocco-bacillus y cocco Gram-negativos, además de cocco Gram-positivos, siendo la flora Gram-negativa la que predomina. Por otra parte, la microflora que forma colonias crema y amarilla, constituye un alto porcentaje (Tabla 1). Costa *et al.* (1998) aislaron colonias pigmentadas de los géneros *Flavobacterium* y *Cytophaga* desde la hemolinfa de un peneido. Así mismo, bacterias Gram-negativas de *Pseudomonas* que suelen formar colonias mucosas de color crema fueron determinadas por Riquelme *et al.* (1995) en un estudio bacteriológico de *A. purpuratus*, no obstante este autor

no estudió la hemolinfa. Por el contrario, Rivera *et al.* (1999) también determinaron *Pseudomonas* en aislaciones hechas de la hemolinfa del crustáceo *Callinectes*. En general, todo este grupo de bacterias encontradas por otros son Gram-negativas y oxidasa citocrómica positiva. Similar consideración puede hacerse de las bacterias aisladas de la hemolinfa en el presente trabajo.

También sugerimos la presencia de *Vibrio*, género que fue determinado por Sano & Tokou (1994) en la hemolinfa de un langostino peneido. Coincidente con nuestros resultados, Olafsen *et al.* (1993a) y Olafsen *et al.* (1993b) señalan que la hemolinfa y las estructuras blandas de bivalvos aparentemente saludables, pueden contener bacterias.

La presencia de una cepa de *Vibro* se ve reflejada en un excelente crecimiento en el medio TCBS a 25°C. Todas las cepas fueron oxidasa citocrómica positiva y su comportamiento en el medio Hugh-Leifson con glucosa fue aerobio y anaerobio facultativo.

Tabla 1
Caracterización de bacterias aisladas de la hemolinfa de *Argopecten purpuratus*
Characterization of bacteria from *Argopecten purpuratus* hemolymph

Bacteria N°	Morfología celular	Tinción Gram	Oxidasa citocrómica	Hugh-Leifson con glucosa	Crecimiento en TCBS	Color de la colonia
1	bacillus	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
2	bacillus	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
3	cocco-bacillus	-	+	Aerobio / Ox	-	Crema
4	cocco	-	+	Sin crecimiento	-	Amarilla
5	cocco-bacillus	-	+	Aerobio / Ox	-	Crema
6	cocco	-	+	Anaerobio facultativo / F	+	Crema
7	cocco	-	+	Aerobio / Ox	-	Naranja
8	cocco-bacillus	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
9	cocco-bacillus	-	+	Aerobio / Ox	-	Crema
10	bacillus	-	+	Sin crecimiento	-	Amarilla
11	bacillus	-	+	Sin crecimiento	-	Crema
12	cocco	-	+	Microaerófilo / Ox	-	Crema
13	cocco	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
14	bacillus	-	+	Sin crecimiento	-	Amarilla
15	cocco	+	+	Anaerobio facultativo / F	+	Amarilla
16	cocco-bacillus	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
17	bacillus	-	+	Sin crecimiento	-	Amarilla
18	cocco-bacillus	-	+	Microaerófilo / Ox	-	Crema
19	cocco	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
20	cocco-bacillus	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
21	cocco	+	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Amarilla
22	cocco-bacillus	-	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Crema
23	cocco	+	+	Anaerobio facultativo / Ox	-	Naranja

Gram positivo = + Gram negativo = - presencia de oxidasa citocrómica = + Ox = oxidativo F = fermentativo
 crecimiento positivo en TCBS = + crecimiento negativo en TCBS = -

Podemos sugerir que la presencia de bacterias en la hemolinfa de *A. purpuratus* es un fenómeno natural tal como se ha informado por Riquelme *et al.* (1995) para las gónadas de este mismo bivalvo. Además, predomina la presencia de bacterias Gram-negativas y entre ellas las bacterias de morfología de bacillus, cocco y cocco-bacillus. Por otra parte, Vincent & Rodrick (2002) demuestran, en forma experimental, la actividad lítica de lisozimas de la hemolinfa de un bivalvo contra cierta bacteria Gram-positiva. Posiblemente los hemocitos realizan una labor retardada en la eliminación de bacterias desde la hemolinfa y son favorecidas en la invasión de esta por fenómenos de estrés muy propio de los cultivos marinos.

Agradecimientos

Nuestros agradecimientos a la Dra. Gloria Arenas por habernos proporcionado una parte de los ostiones usados en su laboratorio y al Sr. Ricardo San Martín por su colaboración técnica. También los autores agradecen la dedicación con que los anónimos correctores contribuyeron a mejorar esta nota científica.

Literatura Citada

- Brady YJ & EL De la Vega. 1992.** Recovery of *Serratia marcescens* in hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* from experimentally seeded water. *Journal of the World Aquaculture Society* 23: 228-231.
- Brady YJ & EL De la Vega. 1990.** Communication. Bacteria in the hemolymph of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Aquatic Animal Health* 4: 67-69.
- Carnegie RV, BJ Barber, DL Distel & D Culloty. 1999.** Development of PCR and in situ hybridisation assay for detection of *Bonamia ostreae* in flat oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of Shellfish Research* 18: 711-712.
- Chávez P & C Riquelme. 1994.** Análisis de la calidad bacteriológica en reproductores de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) para su uso en acuicultura. *Revista Latinoamericana de Acuicultura* 43: 96-99.
- Costa R, I Mermound, S Cloblavi, B Morlet, P Haffner, F Berthe, M Legroumellec & P Grimont. 1998.** Isolation and characterization of bacteria associated with a *Panaeus stylirostris* disease in New Caledonia. *Aquaculture* 164: 297-309.
- McDade J & M Tripp. 1967.** Lysozyme in the hemolymph of oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9: 531-535.
- Harris-Young L, ML Tamplin & WS Fisher. 1993.** Effects of physicochemical factors and bacterial colony morphotype on association of *Vibrio vulnificus* with hemocytes of *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1012-1017.
- Messick GA, SJ Jordan & WF Van-Heukelem. 1999.** Salinity and temperature effects on *Hematodinium* sp. in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Shellfish Research* 18: 657-662.
- Olafsen JA, HV Mikkelsen, HM Giaever, & GH Hansen. 1993a.** Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves. *Journal of Fish Biology* 40: 141-156.
- Olafsen JA, V Lund & Tunkijjanukij Suriyan. 1993b.** Lectins and pentraxins from marine invertebrates and fish: Ligands and functions? *Journal of Fish Biology* 40: 120-125.
- Riquelme C, L Hayashida, N Vergara, A Vásquez, Y Morales & P Chávez. 1995.** Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture* 138: 49-60.
- Rivera A, K Santiago, J Torres, MP Sastre, & FF Rivera. 1999.** Bacteria associated with hemolymph in the crab *Callinectes bocourti* in Puerto Rico. *Bulletin of Marine Science* 64: 543-548.
- Sano T & T Tokou. 1994.** The primary hemocyte culture of kuruma shrimp *Panaeus*. *International Symposium on Biotechnology, applications in aquaculture*, Taipei, Taiwan: 32-33.
- Tortora GJ, BR Funke & CL Case. 1986.** *Microbiology An Introduction*. 3: 59-78. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.