

Especies de la familia *Enterobacteriaceae* en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el río Valdivia

Species of the family *Enterobacteriaceae* in feces of South American sea lion
Otaria flavescens settled in the Valdivia River

Mario González-Fuentes¹, Fadia Latif¹, Fabiola Fernández¹, María P. Villanueva¹,
Jorge Ulloa² y Heriberto Fernández¹

¹Instituto de Microbiología Clínica, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. hfernand@uach.cl

²Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile

Abstract.- This study aims to establish the isolation frequency of species of the family *Enterobacteriaceae* in fecal samples of South American common sea lion (*Otaria flavescens*). Thirty fecal samples were collected from the resting ground of an urban sea lions colony in Valdivia, southern Chile. The bacteria species and their isolation frequencies were *Edwardsiella tarda* (73%), *Escherichia coli* (70%), *Hafnia alvei* (33%), *Morganella morganii* (7%), *Proteus mirabilis* (7%), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (3%), *Serratia rubidea* (3%), *Providencia rustigianii* (3%) and *Citrobacter braakii* (3%).

Key words: Enteral microbiota, marine mammals, reservoir

INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* está conformada por bacilos gram negativos que tienen como hábitat el suelo, cuerpos de agua y el intestino de una amplia variedad de animales terrestres y marinos (Brenner *et al.* 2004). Sin embargo, en Chile pocos vertebrados marinos cuentan con estudios detallados de su microbiota.

El lobo marino común *Otaria flavescens* (Shaw, 1800) es un mamífero que se encuentra ampliamente distribuido en las costas de Chile. Desde 1976 se ha documentado la penetración de este animal al río Valdivia y sus afluentes, comportamiento que obedecería a la búsqueda de alimento (Schlatter 1976). Actualmente existe un estudio de enterobacterias en lobo marino común de cautiverio (Sugita *et al.* 1996) pero son pocos los estudios microbiológicos en el lobo sudamericano *Otaria flavescens* en estado salvaje. Entre estos últimos se cuenta el trabajo de Salinas *et al.* (2010) que establece la presencia de cepas patógenas de *Escherichia coli* en las deposiciones de lobos marinos del norte de Chile. Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de aislamiento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, en heces de lobo marino común, pertenecientes a una colonia urbana de 38 ejemplares, situada en la ribera del río Valdivia, sur de Chile.

MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de un sitio de descanso de lobos marinos *Otaria flavescens*, ubicado en la ribera sur del río Valdivia, sur de Chile (39°47'S, 73°15'W), fueron recolectadas 30 muestras de heces en recipientes estériles y remitidas al laboratorio para análisis bacteriológico. Las muestras fueron sembradas en Agar MacConkey (Oxoid), Agar XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato) (Oxoid), las que fueron incubadas a 37°C por 24 h. A las colonias sospechosas (redondas, solevantadas, convexas, de bordes regulares, lactosa positivas o negativas en Agar MacConkey y del color del medio –rojas- con o sin punto negro central en Agar XLD), se les realizó la prueba de oxidasa para diferenciarlas de bacilos Gram negativos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrios*. La identificación se efectuó mediante pruebas bioquímicas (Koneman *et al.* 2006) (Tabla 1), confirmadas posteriormente por un equipo automatizado [VITEK® bioMérieux].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sugita *et al.* (1996) habían realizado un estudio de la microbiota del lobo común sudamericano, *O. flavescens*, en cautiverio, en el que informaban el aislamiento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque sin

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de las especies de la Familia *Enterobacteriaceae* aisladas de heces de de lobo marino común *Otaria flavescens* / Biochemical tests for species of the Family *Enterobacteriaceae* isolated from fecal samples of the South American sea lion *Otaria flavescens*

	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i>	<i>H. alvei</i>	<i>M. morgani</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. rubidea</i>	<i>P. rustigianii</i>	<i>C. braakii</i>
Producción de Indol	+	+	-	+	-	-	-	+	v
H ₂ S (TSI)	+	-	-	-	+	-	-	-	v
Citrato de Simmons	-	-	v	-	v	v	v	-	+
Lisina descarboxilasa	+	v	+	-	-	+	v	-	-
Arginina dehidrolasa	-	v	-	-	-	-	-	-	v
Omitina descarboxilasa	+	v	+	+	+	-	-	-	+
Hidrólisis de Urea	-	-	-	+	+	v	v	-	v
Utilización Malonato	-	-	v	-	-	v	v	-	-
Gas de Glucosa	+	+	+	v	+	+	v	v	+
Fermentación de:									
Lactosa	-	v	v	-	-	v	+	-	+
Sorbitol	-	v	-	-	-	v	-	-	+
Arabinosa	v	+	+	-	-	v	+	-	+
Sacarosa	-	v	v	-	v	v	+	v	-
Manitol	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Dulcitol	-	v	-	-	-	v	-	-	v
Adonitol	-	-	-	-	-	v	v	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	+	v	-	-
Rafinosa	-	v	-	-	-	+	+	-	-
Motilidad (36°C)	+	v	+	v	+	-	v	v	+

(+) positivo; (-) negativo; (v) variable

identificar las especies. En el presente estudio, fueron aisladas 9 especies de enterobacterias (Tabla 2), lo que concuerda con los resultados publicados por Higgins (2000), quien realizó una revisión sobre las bacterias y hongos aislados de diferentes sitios anatómicos de varios animales marinos como el león marino de California (*Zalophus californianus*) y el delfín mular (*Tursiops truncatus*).

En nuestro estudio, la especie más frecuente dentro de los aislados obtenidos fue *Edwardsiella tarda* (Tabla 2). Coles *et al.* (1978) reconocen que un importante reservorio de esta bacteria son animales marinos, constituyendo parte de su microbiota. Sin embargo, en algunos casos puede comportarse como agente oportunista provocando infecciones como peritonitis. *Edwardsiella tarda* también ha sido descrita como patógeno para peces de agua dulce (e.g., pacu, *Myleus micans*) en su hábitat natural y como patógeno experimental para tilapias (*Oreochromis* spp.) y carpas (*Cyprinus carpio*) (Lima *et al.* 2008).

Escherichia coli, que ocupó la segunda frecuencia de aislamiento (Tabla 2), es una bacteria comensal del

intestino de diferentes especies animales. Es posible que las cepas aisladas tengan el carácter de comensal. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, puede transformarse en patógenos oportunistas y producir cuadros infecciosos extraintestinales (Kim *et al.* 2002). Por otra parte, existen variedades antropogénicas de *E. coli* con potencial enteropatogénico. Una de ellas, *E. coli* enteropatogénica clásica (EPEC) ha sido aislada de lobo fino antártico (*Arctocephalus gazella*) (Hernández *et al.* 2007). Este hecho sugiere la necesidad de investigar si entre los ejemplares de esta colonia urbana pudiese haber portadores de cepas de *E. coli* enteropatógenas antropogénicas, en especial por la cercanía de estos animales con el hombre.

Hafnia alvei es una bacteria que no ha sido asociada a animales marinos, aunque Buck *et al.* (2006) la aislaron en un bajo porcentaje en delfines mulares. Padilla *et al.* (2005), en ensayos de patogenicidad utilizando el pez dorada (*Sparus aurata*), demuestran que esta bacteria tiene capacidad de supervivencia de tres meses en este pez, sin producir signos clínicos de enfermedad.

En nuestro estudio, *Hafnia alvei* ocupó la tercera

Tabla 2. Frecuencia de aislamiento de especies de la familia *Enterobacteriaceae* en 30 muestras de heces de lobo marino común *Otaria flavescens* / Isolation frequency of species of the family *Enterobacteriaceae* in 30 fecal samples of the South American sea lion *Otaria flavescens*

Especie de bacteria	N° muestras positivas	%
<i>Edwardsiella tarda</i>	22	73
<i>Escherichia coli</i>	20	70
<i>Hafnia alvei</i>	10	33
<i>Morganella morganii</i>	2	7
<i>Proteus mirabilis</i>	2	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	3
<i>Serratia rubidea</i>	1	3
<i>Providencia rustigianii</i>	1	3
<i>Citrobacter braakii</i>	1	3

frecuencia de aislamiento. Por esta frecuencia y por los ensayos de Padilla *et al.* (2005), se podría inferir que esta bacteria estaría formando parte de la microbiota intestinal del lobo marino sudamericano establecido en el río Valdivia.

Serratia rubidea, *Providencia rustigianii* y *Citrobacter braakii* fueron aisladas en baja proporción y no han sido reportadas como especies en este tipo de mamíferos. Higgins (2000), Montali *et al.* (1981) y Castinel *et al.* (2007a) han aislado enterobacterias llegando, la mayoría de las veces, a identificarlas sólo a nivel de género. Por tanto, estos serían los primeros informes del aislamiento de *Serratia rubidea*, *Providencia rustigianii* y *Citrobacter braakii* en lobo marino común. Es posible que estas especies formen parte de la microbiota intestinal normal del lobo marino, sin embargo, es necesario realizar estudios de mayor alcance para establecer esta condición y si son capaces de actuar como patógenos oportunistas para mamíferos marinos como ocurre con otras especies de la Familia *Enterobacteriaceae* (Castinel *et al.* 2007a,b, Montali *et al.* 1981).

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* y *Proteus mirabilis* fueron aisladas en baja proporción. Sin embargo, se debe tener presente que *K. pneumoniae* ha sido descrita causando infecciones y muerte en crías de lobo marino en Nueva Zelanda (*Phocarctos hookeri*) (Castinel *et al.* 2007a,b) y especies de *Proteus* han sido asociadas a lesiones cutáneas en otros pinnípedos (Montali *et al.* 1981).

Los integrantes de la colonia urbana de lobos marinos situada en el río Valdivia, se han adaptado a este ecosistema

aprovechando las actividades humanas que ahí se desarrollan (venta de productos del mar), obteniendo alimentos de una manera fácil, lo que explicaría la permanencia de los animales en el lugar. Son necesarios estudios comparativos entre la colonia urbana del río Valdivia y colonias situadas en zonas costeras alejadas de las actividades humanas, para determinar la semejanza de la microbiota intestinal y establecer si la actividad humana de la zona tiene relación con las bacterias aisladas de los animales del río Valdivia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto DID-UACH SE-1-2009 '*Campylobacter insulaenigrae*: distribución ecológica, susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia'. Universidad Austral de Chile. Investigador responsable: Dr. Heriberto Fernández.

LITERATURA CITADA

- Brenner DJ, NR Krieg, JT Staley & GM Garrity. 2004.** Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2. The Proteobacteria: 1- 1256. Springer, Amsterdam.
- Buck J, R Wells, H Rhinehart & L Hansen. 2006.** Aerobic microorganisms associated with Free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 536-544.
- Castinel A, A Grinberg, R Pattison, P Duignan, B Pomroy, L Rogers & I Wilkinson. 2007a.** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates from New Zealand sea lion (*Phocarctos hookeri*) pups during and after the epidemics on Enderby Island, Auckland Islands. *Veterinary Microbiology* 122: 178-184.
- Castinel A, PJ Duignan, WE Pomroy, N Lopez-Villalobos, NJ Gibbs, BL Chilvers & IS Wilkinson. 2007b.** Neonatal mortality in New Zealand sea lions (*Phocarctos hookeri*) at Sandy Bay, Enderby Island, Auckland Islands from 1998 to 2005. *Journal of Wildlife Diseases* 43: 461-474.
- Coles BM, RK Stroud & S Sheggy. 1978.** Isolation of *Edwardsiella tarda* from three sea mammals. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 339-341.
- Hernandez J, V Prado, D Torres, J Waldenström, PD Haemig & B Olsen. 2007.** Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Antarctic fur seals *Arctocephalus gazelle*. *Polar Biology* 30: 1227-1229.
- Higgins R. 2000.** Bacteria and fungi of marine mammals: a review. *Canadian Veterinary Journal* 41: 105-116.
- Kim JH, JK Lee, HS Yoo, N Shin, NS Shin, KH Lee & DY Kim. 2002.** Endocarditis associated with *Escherichia coli* in a sea lion (*Zalophus californianus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14: 260-262.

Koneman EW, SD Allen, W Janda & P Schreckenberger. 2006. *Enterobacteraceae*. En: Koneman EW, SD Allen, WM Janda & PC Schreckenberger (eds). Diagnóstico microbiológico, texto y atlas color, pp. 171-250. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lima LC, AA Fernandes, AAP Costa, FO Velasco, RC Leite & JL Hackett. 2008. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from pacu *Myleus micans*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 60: 275-277.

Montali RJ, M Busch, JD Strandberg, DL Jansen, DJ Boness & JC Whitla. 1981. Cyclic dermatitis associated with *Fusarium* sp. infection in pinnipeds. Journal of the American Veterinary Medical Association 179: 1198-1202.

Padilla D, F Real, V Gómez, E Sierra, B Acosta, S Deniz & F Acosta. 2005. Virulence factors and pathogenicity of

Hafnia alvei for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. Journal of Fish Diseases 28: 411-417.

Salinas P, R Moraga, E Santander & W Sielfeld. 2010. Presencia de cepas diarreogénicas de *Escherichia coli* y estudio de genes de virulencia en aislados desde fecas de dos poblaciones de lobo marino común, *Otaria flavescens* en el norte de Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45: 153-158.

Schlatter R. 1976. Penetración del lobo marino común, *Otaria flavescens* Shaw 1800, en el río Valdivia y afluentes. Medio Ambiente 2: 86-90.

Sugita H, Y Takanashi, Y Sasaki, T Nishina, E Aono, A Fujimoto & Y Deguchi. 1996. The intestinal microflora of sea lions reared in a aquarium. Fisheries Science 62: 321-322.

Recibido el 13 de noviembre de 2009 y aceptado el 29 de enero de 2010