

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
BACTERIAS PATÓGENAS PRESENTES EN LA PIEL DEL  
BAGRE ESTUARINO CHIVO CABEZÓN *Ariopsis bonillai*  
(Miles, 1945) Y EN EL AGUA EN CONDICIONES DE  
LABORATORIO**

**SANDRA MILENA CABANA OROZCO  
GISELA ROCÍO ROA NORIEGA**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN RECURSOS HÍDRICOS  
SANTA MARTA, D.T.C.H.  
2005**

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
BACTERIAS PATÓGENAS PRESENTES EN LA PIEL DEL  
BAGRE ESTUARINO CHIVO CABEZÓN *Ariopsis bonillai*  
(Miles, 1945) Y EN EL AGUA EN CONDICIONES DE  
LABORATORIO**

**SANDRA MILENA CABANA OROZCO  
GISELA ROCÍO ROA NORIEGA**

Memoria de grado presentada como  
requisito para optar al título de Biólogo con Énfasis en  
Recursos Hídricos

**Director  
Saeko Isabel Gaitán Ibarra  
Esp. en Acuicultura**

**Codirector  
Marta Liliana Gómez  
M. Sc. Ciencias Microbiológicas**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN RECURSOS HÍDRICOS  
SANTA MARTA, D.T.C.H.  
2005**

BB  
00022  
EJ 1

**El presente trabajo de Memoria de grado se desarrolló dentro del marco del proyecto "Manejo de reproductores tendientes a la producción masiva de alevinos del bagre estuarino chivo cabezón, *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945) en condiciones controladas", (Universidad del Magdalena - Colciencias)**

**Artículo 147 Literal "F" del Reglamento Interno de la Universidad del  
Magdalena**

**El presidente de Memoria de Grado y el consejo examinador no serán  
responsables de la ideas emitidas por los autores.**



Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

---

**Presidente Memoria de Grado**  
**Saeko Gaitan Ibarra**

---

**Jurado**  
**Lucia Fiorillo Obando**  
**Esp. Microbiología Médica**

---

**Jurado**  
**Sonja Liliana Lozano**  
**Bacterióloga**

Presidente memoria de grado  
Saeko Gaitan Ibarra

**Santa Marta – Magdalena, Agosto 19 del 2005**

## DEDICATORIA

*A Dios, por ayudarme y guiarme hacia el camino del éxito, retirando el agotamiento y la desesperación.*

*Mi madre Ledys, y Mi padre Héctor gracias por darme la vida, por enseñarme todos los valores, sin su amor y sin su apoyo esto no hubiera sido posible. A ustedes les debo todo lo que soy.*

*Mis hermanas Shirley, Nasly, y Daniela, por su tolerancia, colaboración y amor.*

*A mi sobrina Maria Lorena su dulce presencia fue mi alegría en tantos momentos difíciles.*

*Eduardo, por su amor, colaboración y comprensión, tu eres mi apoyo para seguir en esta lucha. Gracias por estar conmigo y no dejarme desfallecer.*

*Mi abuela Gilma, sus palabras me estimularon a seguir con este sueño.*

*Mis tías, por su apoyo.*

*Mis compañeros y amigos*

*Gisela Roa Noriega*



*Dedico este triunfo a Dios por ser esa fuerza sobrenatural que me dio la vida y me permitió cumplir a cabalidad con la meta propuesta.*

*A mis padres Elizabeth Orozco y Juan C. Cabana quienes con su principios, valores, paciencia, comprensión, esfuerzo y dedicación me han enseñado todo lo necesario para salir a delante. Además han sido el pie de fuerza para el cumplimiento de este objetivo. Me han enseñado a valorar a las personas por lo que son y no por lo que tienen. Gracias por apoyarme.*

*A mis hermanas Cristina C. y Maria C. quienes con su apoyo y consejos me ayudaron a superar los momentos más difíciles, convirtiéndose en mis mejores amigas, las quiero mucho.*

*A Iván por confiar en mi y haber sido la primera persona que me condujo hacia este camino.*

Sandra M. Cabana

## **AGRADECIMIENTO**

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a la Universidad del Magdalena, Facultad de Ciencias Básicas, programa de Biología con Énfasis en Recursos Hídricos por brindarnos las bases para nuestra formación profesional.

Agradecemos de igual forma al proyecto "Manejo de reproductores tendientes a la producción masiva de alevinos del bagre estuarino chivo cabezón, *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945) en condiciones controladas", a Saeko Gaitan, Albert Hernandez y al director del proyecto Nicolas Chaparro por el apoyo para la realización de esta investigación.

Al Instituto de investigaciones marinas y costeras (INVEMAR) y en especial a la microbióloga Marta Liliana Gómez por su apoyo y colaboración tanto en las asesorías como en las prestaciones del laboratorio de este instituto, sin esto no hubiese sido posible realizar parte de nuestro estudio.

A los miembros del laboratorio de investigaciones pesqueras tropicales (LIPET); Jairo Altamar y en especial al director Luís Manjarrés Martínez, por ser nuestro asesor en la parte estadística y habernos colaborarnos en algunos aspectos logísticos cuando mas lo necesitábamos. Gracias.

A Félix Cuello, quien se convirtió en un buen amigo y nos ayudó con sus comentarios y sugerencias en gran parte del desarrollo de la investigación.

A los jurados, Lucia Fiorillo Obando Esp. Microbiología médica y Sonja

Liliana Lozano Bacterióloga, por las críticas que contribuyeron al mejoramiento del trabajo.

Al director al Programa de Biología, Juan Camilo Arévalo, por el apoyo en la culminación de esta gran etapa de nuestra vida universitaria.

A los profesores del programa de biología por enseñarnos lo importante y lo interesante de esta hermosa carrera

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo.



## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 GENERAL	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
3. ANTECEDENTES	5
4. HIPÓTESIS	8
5. MARCO TEÓRICO	9
5.1 EFECTOS DE LAS VARIABLES AMBIENTALES SOBRE LA INCIDENCIA DE ENFERMEDADES EN PECES	9
5.1.1 Factores físicos	9
5.1.2 Factores químicos	9
5.1.3 Factores biológicos	9
5.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Ariopsis bonillai</i>	10
5.2.1 Ubicación taxonómica	10
5.2.2 Descripción	10
5.2.3 Distribución geográfica	11
5.2.4 Aspectos biológicos y ecológicos	11
5.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MICROORGANISMOS ESTUDIADOS	12
5.3.1 <i>Escherichia coli</i>	12
5.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
5.3.3 <i>Pseudomona aeruginosa</i> :	12
5.3.4 <i>Vibrio metschnikovii</i>	13
5.3.5 <i>Citrobacter freundii</i>	13

5.3.6 <i>Micrococcus sedentarius</i>	13
5.3.7 <i>Bacillus spp</i>	13
5.3.8 <i>Aeromona hydrophila</i>	14
5.3.9 <i>Corynebacterium bovis</i>	14
5.3.10 <i>Enterococcus faecium</i>	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS ANIMALES	15
6.1.1 Captura de los juveniles de Chivo cabezón	15
6.1.2 Transporte de los animales	16
6.2 monitoreo de los ejemplares en laboratorio	16
6.2.1 Preparación de las piletas en laboratorio	17
6.2.2 Distribución de los ejemplares en las piletas	17
6.2.3 Recambio de agua	18
6.2.4 Realización de biometrías	18
6.2.5 Registro de la temperatura y salinidad	18
6.3 Fundamento de los medios de cultivos utilizados en el experimento	18
6.3.1 Agar TCBS	18
6.3.2 Agar SS	19
6.3.3 Agar MacConkey	19
6.4 Técnica de siembra para el mucus de la piel de los peces	19
6.4.1 Fase de pre-enriquecimiento	19
6.4.2 Fase de enriquecimiento	20
6.4.3 Aislamiento de colonias	21
6.4.4 Identificación bioquímica	21
6.4.5 Lectura de los paneles BBL Crystal	22
6.4.6 Cálculo del número del perfil BBL Crystal	24

6.5 TÉCNICA DE SIEMBRA PARA EL AGUA.	25
6.5.1 Fase de pre-enriquecimiento	25
6.5.2 Fase de enriquecimiento	26
6.5.3 Aislamiento de colonias	26
6.6 DISEÑO ESTADÍSTICO	27
6.6.1 Determinación de diferencias estadísticas	27
6.6.2 Prueba de hipótesis (prueba pareada)	27
6.6.3 Análisis multivariados	28
6.7 VALIDACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1 INFLUENCIA DEL SEXO EN EL NUMERO DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS	29
7.2 FACTORES ABIÓTICOS MEDIDOS EN LAS PILETAS DURANTE EL ENSAYO (SALINIDAD Y TEMPERATURA)	29
7.3 COMPORTAMIENTO DEL PESO Y TALLA PROMEDIO DE LOS ANIMALES DURANTE EL ENSAYO	30
7.4 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS	32
7.5 COMPARACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA ENTRE LA PIEL Y AGUA DE PILETAS	35
7.6 ANÁLISIS MULTIVARIADO	35
7.7 COMPROBACIÓN de HIPÓTESIS	37
7.8 ANÁLISIS DE LAS CEPAS PROVENIENTES DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS (PIEL Y AGUA)	38
7.8.1 Identificación de las cepas bacterianas en el agua CGSM	38
7.8.2 Identificación de las cepas bacterianas aisladas en la piel del <i>Ariopsis bonillai</i>	39



7.9 ABUNDANCIA DE LAS CEPAS AISLADAS DEL AGUA DE LA CGSM, PILETAS Y PIEL DEL CHIVO CABEZÓN.	43
7.10 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS CEPAS EN LAS MUESTRAS DE AGUA DE LA CIENAGA GRANDE DE SANTA MARTA	47
7.11 LESIONES OBSERVADAS EN LA PIEL DEL CHIVO CABEZÓN	51
8. CONCLUSIONES	53
9. RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	59

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Prueba de Chi-cuadrado para el lote A que determina la dependencia del número de cepas bacterianas presentes en la piel de <i>Ariopsis bonillai</i> de acuerdo al sexo.	29
Tabla 2. Características macroscópicas de las cepas aisladas de la piel de <i>Ariopsis bonillai</i> y del agua en condiciones de laboratorio.	34
Tabla 3. Características microscópicas de las cepas aisladas de la piel de <i>Ariopsis bonillai</i> y el agua en condiciones de laboratorio.	34
Tabla 4. Tipo III de contrastes de efectos fijos(a) para el lote B realizado en el programa SPSS 11.5	35
Tabla 5. Tipo III de contrastes de efectos fijos(a) para el lote C realizado en el programa SPSS 11.5	35
Tabla 6. Test de comprobación de hipótesis, mediante la prueba de los signos de muestras pareadas para el lote B, analizando muestras de la Piel y Agua de las piletas para cada uno de los medios de cultivo.	37
Tabla 7. Test de comprobación de hipótesis, mediante la prueba de los signos de muestras pareadas para el lote C, analizando muestras de la Piel y Agua de las piletas para cada uno de los medios de cultivo.	37

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Aspecto general de <i>Ariopsis bonillai</i> Chivo cabezón.	10
Figura 2. Mapa de la Ciénaga Grande de Santa Marta resaltando la zona donde se capturaron los animales, Modificado Encarta® 2005.	15
Figura 3. Frotis de la piel de <i>Ariopsis bonillai</i> utilizando la plantilla y el escobillón para su posterior siembra en caldos de pre-enriquecimiento.	20
Figura 4. Aspecto general de las colonias bacterianas aisladas en los medios de cultivos utilizados durante la investigación.	21
Figura 5. Extracción de cepas puras para realizar posteriormente la prueba de oxidasa.	22
Figura 6. Prueba de oxidasa de especies bacterianas aisladas de la piel y del agua de las piletas para pruebas bioquímicas.	23
Figura 7. Panel de BBL Crystal utilizado para la identificación de especies bacterianas aisladas en el laboratorio.	24
Figura 8. Hoja de código para la identificación de BBL Crystal (a) Gram positiva (b) Gram negativa.	25
Figura 9. Filtración de las muestras de agua de las piletas y de la CGSM por el método de membrana.	26



- Figura 10. Comportamiento de la temperatura del agua de las piletas antes y después del recambio de agua efectuado en las (a) mañanas y (b) tardes. 30
- Figura 11. Crecimiento en talla y peso promedio de los juveniles de *Ariopsis bonillai* en condiciones de laboratorio correspondientes al lote B (a) y lote C.(b). 32
- Figura 12. Vista macroscópica y microscópica de algunas de las cepas bacterianas aisladas de las muestras de agua de la CGSB, piletas y piel del *Ariopsis bonillai*. 33
- Figura 13. Análisis de similaridad del número total de UFC/ml de muestras obtenidas de la piel de *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945) en condiciones de laboratorio. a) Dendograma de clasificación de Bray Curtis b) Mapa de ordenación MDS indicando los grupos determinados. 36
- Figura 14. Análisis de similaridad del número total de UFC/ml de muestras obtenidas del agua de las piletas en condiciones de laboratorio. a) Dendograma de clasificación de Bray Curtis b) Mapa de ordenación MDS indicando los grupos determinados. 37
- Figura 15. Composición porcentual del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de la Ciénaga Grande de Santa Marta, efectuados en julio y agosto 38
- Figura 16. Composición porcentual del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de las piletas durante los meses de julio - agosto 2004. 39



- Figura 17. Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas de la piel de *Ariopsis bonillai* durante los meses de julio y agosto 2004 40
- Figura 18 Composición porcentual del número total de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas de la piel de *Ariopsis bonillai*, (a) y del agua de las piletas (b) en los diferentes medios de cultivos (AN, MK, SS y TCBS) 41
- Figura 19. Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de la Ciénaga en los diferentes medios de cultivos (Agar Nutritivo, MacConkey, SS Y TCBS). 42
- Figura 20. Distribución porcentual del número total de UFC/ml por medio de cultivo 43
- Figura 21. Concentración de UFC/ml aislada de las muestras de agua de la Ciénaga Grande de Santa Marta 44
- Figura 22. Concentración de UFC/ml aislada de las muestras de agua de las piletas 45
- Figura 23. Concentración de UFC/ml aislada de las muestras del frotis de la piel del Chivo cabezón 46
- Figura 24. Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de la Ciénaga, agua de las piletas y la piel de *Ariopsis bonillai* durante los meses de julio y agosto del 2004. 47

- Figura 25. Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de las piletas durante el mes de julio (a) y agosto (b) del 2004 48
- Figura 26. Composición porcentual del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de las piletas y la piel con y sin la aplicación de tratamiento profiláctico (CT- ST) Para el lote B (a) y C (b) 49
- Figura 27. Variación del número total de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas de las muestras con la aplicación de tratamiento profiláctico (CT) en los lotes B (a) y C (b). 50
- Figura 28. Lesiones externas de la piel del Chivo cabezón ocasionadas por bacterias 52

## LISTA DE ANEXOS

Anexo a. Pruebas bioquímicas para la determinación de microorganismos Gram positivos aislados en la piel de *Ariopsis bonillai* y en el agua en condiciones laboratorio.

Anexo b. Pruebas bioquímicas para la determinación de microorganismos Gram negativos aislados en la piel de *Ariopsis bonillai* y en el agua en condiciones laboratorio.

LISTA DE ANEXOS

## Resumen

Con el fin de identificar las bacterias patógenas para el chivo cabezón *Ariopsis bonillai* presentes en la piel y en su medio hidrológico, se realizó un estudio durante tres (3) meses (junio – agosto del 2004), capturándose tres lotes de 20 individuos en la parte sur y centro de la Ciénaga Grande de Santa Marta, teniendo en cuenta que se encontrarán sanos y sin signos de maltrato, esta actividad se efectuó en tres fechas diferentes, el primero de los lotes (lote A) se capturo en junio, el segundo en julio (lote B) y el tercero en agosto (lote C), por el método del bolicheo, así mismo se tomaron muestras de agua de la CGSM y se midieron las variables salinidad y temperatura. Para cada animal se determinaron variables morfológicas (longitud total y peso), para las muestras de piel y agua se realizo una cuantificación de *Aeromona hydrophila*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus sedentarius*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Vibrio metschnikovii*, estos datos fueron procesados mediante los programas SPSS® versión 11.5, STATGRAPHICS® versión 5.1, PRIMER® 5, y el software BBL Crystal, con la finalidad de aplicar pruebas estadísticas como anidado, Chi cuadrado, prueba de hipótesis, comparación de dos muestras y análisis de similaridad. Los resultados bacteriológicos realizados a las muestras de piel, agua de la CGSM y agua de las piletas, mostró para el agua de la CGSM la presencia de *B. circulans*, *V. metschnikovii* y *C. freundii* con un 38% a 73% de UFC/ml en las dos fechas de capturas. En el agua de las piletas se presentó *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* y *B. circulans* con porcentajes que variaron entre un 47% a 76% en todos los muestreos del lote B, en la muestra de piel se identificaron 12 especies bacterianas con los mayores porcentajes de UFC indicando con esto que la piel es un medio idóneo para la proliferación bacteriana. Este estudio permitió concluir que la carga bacteriana de la piel de los peces es el reflejo directo del agua en la que viven, al presentarse porcentajes de UFC similares en ambas muestras (piel y agua), además la presencia de especies como; *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* y *B. circulans* en la piel inducen pensar que son las causantes de lesiones e incluso de la muerte de *Ariopsis bonillai* en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: *Ariopsis bonillai*, Patógeno, proliferación bacteriana, lesiones.



## 1. INTRODUCCIÓN

Un ecosistema está definido como una unidad ecológica, en la cual sus componentes físicos, químicos y biológicos interactúan para producir alguna clase de estabilidad (Gómez, 1999), cuando esta estabilidad es afectada por agentes externos, sus componentes se desequilibran presentando ambientes favorables para el florecimiento de agentes patógenos; esto estimula el desarrollo de investigaciones con relación a los efectos de las variables ambientales sobre la salubridad de los peces, por esta razón, la carga bacteriana está influida por el entorno climático, social, físico y alimenticio que conlleva a una variación en la concentración de los microorganismos patógenos, convirtiéndose en un problema para los peces (Kinkelin *et al.*, 1991).

Los parámetros del medio acuático pueden producir efectos directos o indirectos sobre los peces, los directos se manifiestan como lesiones, por ejemplo: la acentuada disminución en el pH que lacera los epitelios branquiales; los indirectos pueden observarse como un alto nivel de estrés. Esto conduce a una disminución en la resistencia a las enfermedades provocadas por bioagresores presentes en el medio y aún en el mismo individuo, por ejemplo: las bacterias oportunistas.

Los cambios fisiológicos y bioquímicos, que se producen en el pez como respuesta al estrés ambiental, son inespecíficos y se desarrollan en tres fases: 1. una reacción de alarma, 2. una fase de resistencia durante la cual, la capacidad de adaptación mantiene la homeostasis a pesar de los cambios circunstanciales y 3. Una fase de agotamiento, cuando la señal

de alarma persiste y la adaptación no es suficiente y el equilibrio no se puede mantener (Gómez, 1999).

Muchas de las enfermedades de los peces se deben a microorganismos que hacen parte de la flora normal de éstos y que sólo se hacen patógenos bajo la influencia de variaciones del medio ambiente, como lo son; el cambio brusco de temperatura, la contaminación, el estrés hormonal o alimenticio (Roberts, 1981).

Cuando los peces son tomados del medio natural y llevados a un laboratorio en donde se tratan de simular las condiciones naturales, son sometidos a cambios, estos pueden generar estrés y alteraciones en su sistema inmunológico, lo que los hace más susceptibles al ataque de bacterias patógenas que causan daños graves o incluso la muerte. Esto conllevó a preguntarnos, ¿El cautiverio proporciona condiciones para que se presenten enfermedades de origen bacteriano en los peces?

Los bagres de la familia Ariidae a la cual pertenece *Ariopsis bonillai*, constituyen un recurso que puede ser aprovechado adicionalmente en la acuicultura; aunque, en este momento no se cuente con una biotecnología de cultivo bien establecida para el manejo de ésta especie, puesto que es poco lo que se conoce sobre su comportamiento en cautiverio. Debido a la importancia biológica y económica, se hace necesario realizar estudios que permitan conocer más sobre este bagre estuarino, sobre todo si se tiene en cuenta que actualmente es la especie con los índices más grandes de captura en la Ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM) (INVEMAR *et al.*, 2000).

La presente investigación contribuye al conocimiento de aspectos patológicos de esta especie nativa y endémica en condiciones de laboratorio. Con la finalidad de aislar, caracterizar e identificar bacterias patógenas para esta especie en cautiverio. Además ofrece herramientas que permiten plantear posibles alternativas para cultivos controlados en laboratorio.

Esta investigación fue desarrollada en el marco del proyecto "Manejo de reproductores tendientes a la producción masiva de alevinos del bagre estuarino Chivo cabezón, *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945) en condiciones controladas", financiado por COLCIENCIAS y la Universidad del Magdalena.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GENERAL

Aislar, caracterizar e identificar bacterias patógenas presentes en la piel del Chivo cabezón *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945), en el agua de la CGSM y de las piletas en condiciones de laboratorio.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ◆ Caracterizar macroscópica y microscópicamente los morfotipos bacterianos encontrados en la piel del Chivo cabezón *Ariopsis bonillai* en el agua de la CGSM y de las piletas del laboratorio.
- ◆ Determinar la abundancia de morfotipos presentes en la piel de los peces y en el agua expresada en unidades formadoras de colonias (UFC/ml).
- ◆ Identificar mediante pruebas bioquímicas BBL CRYSTAL® las bacterias presentes en la piel y en el agua.
- ◆ Comparar la carga bacteriana de la piel con las encontradas en el agua.



### 3. ANTECEDENTES

Las enfermedades bacterianas son responsables de graves mortalidades tanto en los peces en estado libre como en cautiverio, el agua, sobre todo cuando contiene un exceso de materia orgánica, es un medio ideal, para el crecimiento de muchos géneros de bacterias; varios investigadores han demostrado que la carga bacteriana normal de los peces es el reflejo directo de la carga bacteriana del agua en la que viven (Roberts, 1981).

La primera enfermedad bacteriana descrita fue la peste roja de las anguilas, Bonaverí la describió por primera vez en 1728, en la costa Italiana del Adriático. En el transcurso de este siglo, han sido decisivas dos circunstancias en el desarrollo y conocimiento de las enfermedades bacterianas de los peces; la primera, en 1929, con la creación en Escocia de la Parliamentary Committee of Enquiry para el estudio de la furunculosis, enfermedad que había causado enormes pérdidas en los Salmones de los ríos Escoceses; el segundo fue el desarrollo, sobre todo en América y Japón, de métodos de piscicultura que inducen regularmente efectos de estrés y pueden favorecer la aparición de numerosas enfermedades bacterianas en los peces (Roberts, 1981).

El primer reporte de *Streptococcus* fue realizado en 1970 por Wu en Taiwán, con cultivos de Tilapia, que provocó mortalidades masivas; el *Streptococcus* aislado se identificó como *S. pyogenes*  $\beta$ -hemolítico. Posteriormente, el patógeno se ha desarrollado dentro de los cultivos de Tilapia a nivel mundial, es así como se ha aislado en Japón, Taiwán, Israel, Arabia Saudita y Estados Unidos (Conroy y Conroy, 1997 En:

Rodríguez *et al.*, 2001).

En Noruega, se piensa que *Vibrio salmonicida* puede ser el factor que más contribuye en la enfermedad de Hitra, un evento que produce grandes pérdidas en las poblaciones del Salmón del Atlántico, la enfermedad suele observarse cuando la temperatura del agua es baja y se presentan muchas lluvias, lo que ocasiona disminución en la calidad del agua (Brown, 2002).

Según Kinkelin *et al.* (1991) Se pueden distinguir enfermedades de agua dulce (generadas por *Mixobacterias*, *Aeromonas*, *Lactobaccillus*); de agua salada (ocasionadas por *Vibrio*, *Pasteurella*); de agua fría o templada (la mayoría de las infecciones de los Salmonidae) y de agua cálida (*Epiteliosistis*, *Pasteurella*, *Edwardsiella*).

Pillay (1997) afirma que las condiciones ambientales de estanques de cultivo a alta densidad de *Clarias* spp. (Bagre asiático) dan por resultado una alta frecuencia de enfermedades y mortalidad, que a menudo diezman casi la mitad de los peces sembrados. Las tres infecciones más comunes de este bagre son; la branquial por *Trichodina*, la renal bacteriana y la infección por *Gyrodactylus*. Las enfermedades por *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Flexibacter columnaris*, *Pseudomona* spp. y *Edwardsiella tarda*. Se han identificado como *Clarias batrachus* y *Clarias macrocephalus*. En el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), se presenta con frecuencia la septicemia hemorrágica y la columnaris, que son enfermedades bacterianas importantes que causan considerables mortalidades.



En Colombia, han sido reportadas *Aeromona hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae* como componentes de la carga normal en cultivos intensivos de Tilapia roja (*Oreochromis sp*), igualmente fue aislada en un cultivo de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) una cepa con característica similares a *Aeromona salmonicida* (Villanueva, 1994). Sin embargo se requieren nuevos aislamientos y la caracterización molecular de las cepas aisladas que identifique plenamente la bacteria, debido a que no ha sido reportada en Colombia y es importante dado su alto poder patológico, ya que puede producir pérdidas del 5% al 100% de las Tilapias cultivadas en agua dulce y salobre (Baddour, 1992; Conroy y Conroy, 1997 En: Rodríguez *et al.*, 2001).

Desafortunadamente los estudio que involucran en forma profunda los aspectos bioecológicos y pesqueros de los Áridos son muy escasos a nivel regional, nacional y aún mundial (Galvis, 1984).

## 4. HIPÓTESIS

El cautiverio genera estrés y alteraciones en el sistema inmunológico de los peces, esto los hace vulnerables al ataque de bacterias que en determinado momento hicieron parte de la carga bacteriana normal de estos, y que bajo estas condiciones se desencadenan un cuadro patológico causando daños graves e incluso la muerte de los animales.

Las especies bacterianas presentes en la piel del chivo cabezón corresponden a las bacterias presentes en el agua de la CGSM.



## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 EFECTOS DE LAS VARIABLES AMBIENTALES SOBRE LA INCIDENCIA DE ENFERMEDADES EN PECES

**5.1.1 Factores físicos.** Están principalmente definidos por las propiedades físicas del agua, como: temperatura, conductividad, oxidabilidad, demanda biológica de oxígeno y contenido de materia orgánica en suspensión. Estas características del medio acuático confieren a los peces determinadas desventajas, que éstos deben superar permanentemente por el efecto sobre su patología y condiciones de explotación (Kinkelin *et al.*, 1991).

**5.1.2 Factores químicos.** Son principalmente las propiedades inherentes a la composición del agua como: pH, alcalinidad, contenido de gases disueltos. Otro factor de orden químico, es la alimentación considerada desde el punto de vista tanto cualitativo como cuantitativo (Kinkelin *et al.*, 1991).

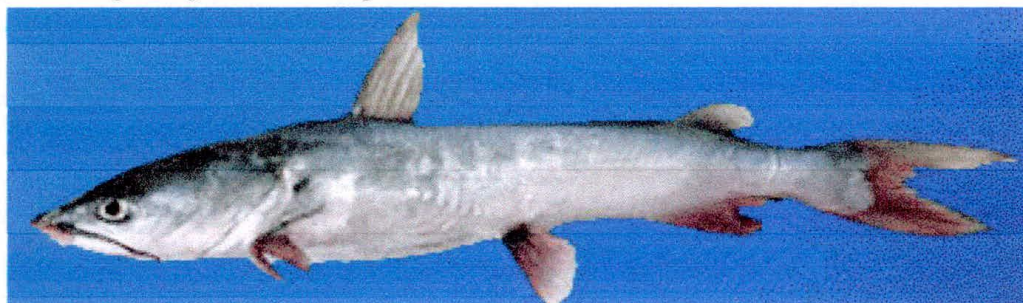
**5.1.3 Factores biológicos.** Los virus, bacterias y parásitos se consideran bioagresores para los peces y son las principales causas de las enfermedades de ellos. Estos están condicionados en gran medida por factores físicos y químicos del medio ambiente (Gómez, 1999).

Los peces, albergan a los bioagresores según distintas modalidades que van desde el portador sano, al animal inmune pasando por el enfermo

clínicamente detectable (Kinkelin *et al.*, 1991).

## 5.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Ariopsis bonillai*

Figura 1. Aspecto general de *Ariopsis bonillai* Chivo cabezón.



### 5.2.1 Ubicación taxonómica

Phylum	Chordata
Clase	Pisces
División	Euteleostei
Superorden	Ostaiophysi
Serie	Otophysi
Orden	Siluriformes
Familia	Ariidae
Genero	<i>Ariopsis</i> (Gill, 1861)
Especie	<i>Ariopsis bonillai</i> (Miles, 1945)
Nombre Común	Chivo cabezón

**5.2.2 Descripción.** Se caracteriza por presentar 2 pares de barbillones mentonianos de sección circular (Figura 1), igual que el par de los maxilares. Dientes de paladar pequeños distribuidos en dos parches a cada lado, surco medial corto, su coloración es de gris oscuro a gris

azuloso, vientre de color blanco azuloso y alcanza hasta los 80 cm de longitud total (Cervigón, 1991 En: Mejía y Acero, 2002).

**5.2.3 Distribución geográfica.** Registrada para el Caribe colombiano (Acero *et al.*, 1986 En Mejía y Acero, 2002). En las ecoregiones Magdalena: Ciénaga de Tesca y Ciénaga Grande de Santa Marta (Riaño y Salazar, 1982; Toro y Villa, 1983; Galvis, 1984; Santos-Martínez y Acero, 1991 En Mejía y Acero, 2002) y Morrosquillo, Bahía de Cispata (INVEMAR, 2002; en Mejía y Acero, 2002).

**5.2.4 Aspectos biológicos y ecológicos.** *Ariopsis bonillai* es de hábitos costeros y bentónicos encontrándose principalmente sobre fondos fangosos de aguas turbias dulces y salobres como lagunas costeras, partes bajas de los ríos, estuarios, ciénagas y zonas de manglar (Taylor y Menezes, 1978; Riaño y Salazar, 1982 En: Mejía y Acero, 2002).

Su alimentación cambia de acuerdo a la talla y se basa principalmente en invertebrados bentónicos como crustáceos y poliquetos, aunque incluyen también insectos, peces, algas y detritos (Toro y Villa, 1983).

Los machos desde los 4 a 5 meses alcanzan la diferenciación sexual, éstos son de menor tamaño que las hembras, debido a una interrupción del crecimiento durante el prolongado periodo de incubación de los huevos en la boca, imposibilitándose la ingestión de alimentos (Galvis, 1984).



## 5.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MICROORGANISMOS ESTUDIADOS

**5.3.1 *Escherichia coli*:** bacilo Gram negativo (1.1 a 1.5  $\mu\text{m}$  x 2.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ ), móvil con flagelos peritricos, anaerobio facultativo, fermentador de carbohidratos, utiliza el acetato como única fuente de carbono, además posee una estructura antigénica compleja, produce diversas toxinas y factores de virulencia como el pili y la cápsula, posee metabolismo respiratorio y fermentativo (Holt, 2000). Otra característica específica de esta especie es la actividad de la enzima  $\beta$  - glucuronidasa (Merck, 1994).

**5.3.2 *Staphylococcus aureus*:** coco Gram positivo, crece en concentraciones por encima del 10% de NaCl a una temperatura de 30 a 37 °C, con valores de pH entre 4.2 y 9.3, posee metabolismo respiratorio y fermentativo, produce ácido aeróbicamente a partir de la fructosa, galactosa, manosa, ribosa, y anaeróbicamente desde la glucosa, lactosa, maltosa y manitol (Holt *et al.*, 1995).

**5.3.3 *Pseudomona aeruginosa*:** bacilo Gram negativo, móvil, con flagelos polares, quimio-organotrofos oxidativos y aerobios estrictos (Holt, 2000) es un patógeno oportunista típico, iniciando una infección cuando el animal se encuentra bajo de defensa, causante de infecciones sistémicas en individuos con amplias lesiones de piel, es resistente a los antibióticos utilizados rutinariamente, produce; piocianina y pigmento fluorescente verde-amarillento soluble en agua, reacciones de oxidasa positiva y crece hasta los 43°C (Madigan *et al.*, 2004).

**5.3.4 *Vibrio metschnikovii*:** bacilo Gram negativo (0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  x 1.4 a 2.6  $\mu\text{m}$ ), móvil con flagelos polares, anaerobio facultativo, con metabolismo respiratorio y fermentativo, crece entre los 20 °C o más de 30 °C. La D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido, produciendo una reacción positiva a la oxidasa, los iones de sodio son un requerimiento absoluto para el crecimiento de esta especie, común en habitats acuáticos marinos o estuarios, y en el intestino de los animales marinos (Holt *et al.*, 2000).

**5.3.5 *Citrobacter freundii*:** bacilo Gram negativo (1  $\mu\text{m}$  x 2 a 6  $\mu\text{m}$ ), móviles por flagelos peritricos son anaerobios facultativos, es patógeno oportunista, quimio-organotrofo que posee los dos tipos de metabolismo respiración y fermentación. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C, la D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizado produciendo ácido y gas, no muestra reacción frente a la oxidasa y si a la catalasa y citrato. Es común en heces de animales (Holt *et al.*, 1995).

**5.3.6 *Micrococcus sedentarius*:** coco Gram positivo (0.5 a 2.0  $\mu\text{m}$ ), estrictamente anaerobio, quimio-organotrofo con metabolismo respiratorio, produce ácido a partir de carbohidratos, posee reacciones positivas frente a la catalasa y oxidasa, es halotolerante creciendo en concentraciones de NaCl del 5%, resistente a la lysostophin, su temperatura óptima de crecimiento es de 25 °C a 37 °C (Holt *et al.*, 2000).

**5.3.7 *Bacillus spp.*:** bacilos Gram positivos (0.5 a 2.5 x 1.2 a 1.0  $\mu\text{m}$ ), móviles por flagelos peritricos, resistentes a condiciones adversas, son

aerobios o anaerobios facultativos con una amplia tolerancia fisiológica al calor, salinidad y pH, tienen metabolismo fermentativo y respiratorio, catalasa positiva, fundamentalmente con un amplio rango de habitas, son mesofilos, quimio-organotrofos, los miembros del genero bacillus son fáciles de aislar en el agua, tierra y aire (Holt *et al.*, 2000).

**5.3.8 *Aeromona hydrophila*:** bacilo Gram negativo (0,3 a 1,0 x 1,0 a 3,5  $\mu\text{m}$ ), móvil con un flagelo polar, quimio-organotrofos, poseen los dos tipos de metabolismo respiratorio y fermentativo, temperatura de crecimiento es de 22°C a 28°C, D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizado con la producción de ácido y a menudo gas, oxidasa y catalasa positiva, reduce nitratos, se encuentran en aguas frescas y aguas residuales, algunas especies son patógenas para ranas, peces y humanos (Holt *et al.*, 2000).

**5.3.9 *Corynebacterium bovis*:** bacilo Gram positivos (0.4 x 0.8  $\mu\text{m}$ ), inmóvil, no resistente a los ácidos con tendencia a la variabilidad morfológica, apareciendo como cocos, bacilos cortos o incluso formas ligeramente ramificadas (Klinke, 1982), son microorganismos aerobio, parcialmente ácido-alcohol resistentes, no esporulados ([www.monografias.com/trabajos/bactevet/bactevet.shtml](http://www.monografias.com/trabajos/bactevet/bactevet.shtml)).

**5.3.10 *Enterococcus faecium*:** coco positivos (0.5 a 0.75 x 1.0 a 2.5  $\mu\text{m}$ ), respiratorio y quimioorganotrofo fermentativo, puede ser móvil o inmóvil (Roberts, 1981).

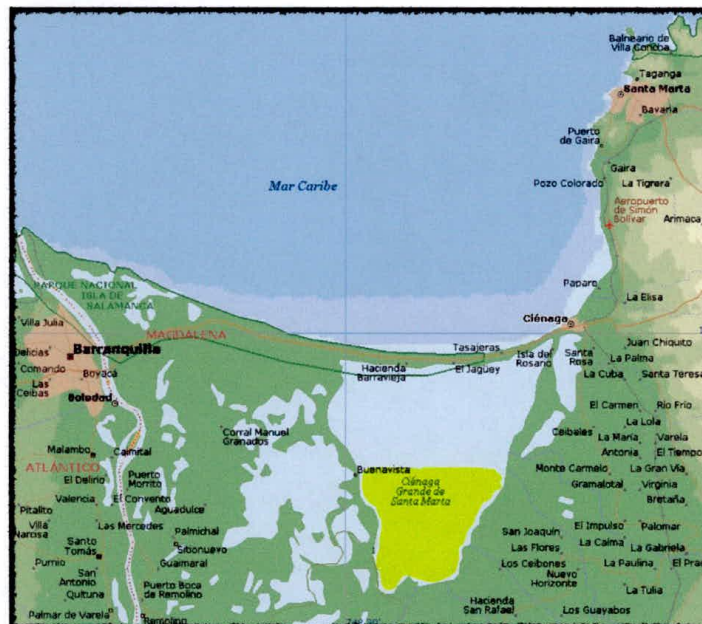


## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS ANIMALES

**6.1.1 Captura de los juveniles de Chivo cabezón.** Se capturaron 3 lotes de 20 individuos de Chivo cabezón *Ariopsis bonillai* en la parte sur y centro de la CGSM (Figura 2), seleccionándolos con las siguientes condiciones; tallas que oscilaran entre 19 y 21 cm, que se encontraran sanos y sin signos de maltrato. Esta actividad se efectuó en tres fechas diferentes del 2004, el primero de los lotes (lote A) se capturó en junio, el segundo en julio (lote B) y el tercero en agosto (lote C) del 2004, la captura de los animales se realizó por el método de bolicheo (redes de enmalle).

**Figura 2. Mapa de la Ciénega Grande de Santa Marta resaltando la zona donde se capturaron los animales, Modificado Encarta® 2005.**



Durante la captura de los animales se tomó una muestra de 500 ml de agua de la CGSM en un frasco estéril, a la cual se le realizó el análisis bacteriológico junto con el frotis de piel de cada uno de los peces, este ultimo se realizó cuando los individuos llegaron al laboratorio para saber cual era la carga bacteriana normal de estos y del medio donde habitan.

**6.1.2 Transporte de los animales.** En la embarcación usada, el agua de dos tanques de polietileno de 250 l con los peces, fue cambiada cada 20 minutos para disminuir la temperatura y mantenerla oxigenada. Durante el transporte por carretera al laboratorio de maricultura del Centro Planta Piloto Pesquera de Taganga de la Universidad del Magdalena localizado en la población de en los 11° 5' N y 79° 12' W, separado de Santa Marta por 3.5 Km se adicionaron aproximadamente 20 Kg de hielo a cada tanque, con el fin de mantener la temperatura del agua igual a la registrada en el sitio de captura (Chaparro *et al.*, 2002).

## **6.2 MONITOREO DE LOS EJEMPLARES EN LABORATORIO**

La mitad de los ejemplares juveniles del Chivo cabezón transportados desde la CGSM fueron sometidos a un baño consistente en 84 mg de Ampicilina, 560 mg de Mebendazol y 84 gotas de Azul de metileno (Tratamiento profiláctico - CT) para controlar la carga bacteriana presente en la piel del animal, el resto de los animales no fue tratado con ningún tratamiento antes de ser colocados en piletas para realizarle el monitoreo diario, en el laboratorio de reproducción de peces marinos, y la fase microbiológica (aislamiento, caracterización e identificación bioquímica de las cepas bacterianas) se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología



del Centro Planta Piloto Pesquera de Taganga

**6.2.1 Preparación de las piletas en laboratorio.** Se prepararon 4 piletas plásticas cuadradas con dimensiones de 110 x 130 cm, llenas con agua a la salinidad y temperatura registradas en el sitio de captura, marcándose con los números 1, 2, 3 y 4, cada pileta contenía un volumen de agua de 350 l, previamente filtrado y esterilizado con rayos ultravioleta, además se mantenían con recambio y aireación constante. El lavado y limpieza de piletas se realizaba cada 5 días, con agua dulce y jabón, y desinfectándolas con una solución de ácido muriático al 5%, colocándose al sol y retirando los residuos de ácido con abundante agua dulce.

**6.2.2 Distribución de los ejemplares en las piletas.** Los 20 ejemplares fueron distribuidos al azar en las piletas hasta completar 5 en cada una de estas. Marcando las piletas 1 y 2 con tratamiento y la 3 y 4 sin tratamiento.

Los animales se alimentaban con pescado fresco en cantidades correspondiente al 5% de su biomasa dividida en dos raciones, una en las primeras horas de la mañana y la otra por la tarde.

**6.2.3 Recambio de agua.** Diariamente se realizaron dos recambios (mañana y tarde) del 75% del total del agua para cada pileta, después de cada aplicación de alimento se limpiaban las paredes de las piletas y las mangueras de aireación con esponjas y agua dulce. Posteriormente, los residuos de alimento y desechos se extraían de las piletas por medio de la

aspiración de agua del fondo a través de mangueras.

Las mangueras, baldes, esponjas y demás implementos usados para la limpieza y recambio del agua fueron marcados y separados por tratamiento a fin de evitar el riesgo de contaminación cruzada, además eran colocados en tasas con agua clorinada al 5% para su desinfección y antes de ser utilizados se enjuagaron con abundante agua dulce para eliminar los residuos de cloro.

**6.2.4 Realización de biometrías.** Las biometrías fueron realizadas cada 10 días, y se registraba para cada ejemplar el peso y la talla, después de cada biometría, se hacía el ajuste correspondientes a la ración de alimento diario para cada pileta.

**6.2.5 Registro de la temperatura y salinidad.** Se realizaron registros diarios de la temperatura antes y después de cada recambio de las piletas (mañana y tarde) con un termómetro digital marca texto 96® con precisión de 0.1°C. La salinidad se midió con un refractómetro wtw lf 191®.

## **6.3 FUNDAMENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO**

**6.3.1 Agar TCBS.** Medio con elevadas concentraciones de tiosulfato y citrato, sales biliares, sacarosa para el aislamiento y cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros vibriones enteropatógenos (*V. parahaemolyticus*, *vibrio NAG*), inhiben notablemente a las enterobacteriáceas, forman colonias amarillas (Merck, 1994).

**6.3.2 Agar SS.** Para el aislamiento de *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*, a partir de heces, alimentos y otros materiales objetos de investigación, la elevada concentración de tiosulfato y citrato inhiben considerablemente la carga bacteriana acompañante. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias. Las colonias de gérmenes lactosa-negativo son incoloras y las lactosa positivos son rosadas hasta pueden presentar una tonalidad rosada. Las colonias de microorganismos formadores de H<sub>2</sub>S presentan un centro negro (Merck, 1994).

**6.3.3 Agar MacConkey.** Selectivo para el aislamiento de *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, y bacterias coliformes. sus sales biliares y el violeta cristal inhiben considerablemente la carga Gram positiva. La lactosa, junto con el indicador de pH rojo neutro sirven para comprobar la degradación de dicha azúcar. Las colonias lactosa-negativas son indicadoras y las lactosas-positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocadas por los ácidos biliares (Merck, 1994).

#### **6.4 TÉCNICA DE SIEMBRA PARA EL MUCUS DE LA PIEL DE LOS PECES**

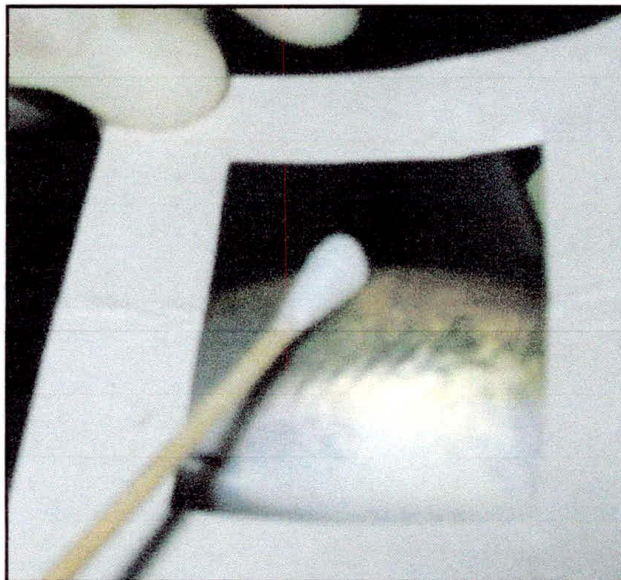
A cada uno de los 20 ejemplares se le realizó un proceso que consistió en:

**6.4.1 Fase de pre-enriquecimiento.** Se tomó un pez y con dos escobillones estériles se frotó la piel cinco veces, utilizando una plantilla estéril (Figura 3) de cartulina (5 x 4cm) para un barrido total de 100 cm<sup>2</sup>. Uno de los escobillones fue introducido en un frasco estéril de 100 ml con



caldo peptonado al 0.1% tamponado y el otro se introdujo en un frasco estéril de 100 ml de agua peptonada alcalina (pH = 8.3). Este procedimiento se repitió para los 19 ejemplares restantes, completando un total de 40 frascos que correspondieron a dos por cada ejemplar; se incubaron a una temperatura de 35 a 37 °C durante 48 horas (Del Puerto *et al.*, 1992).

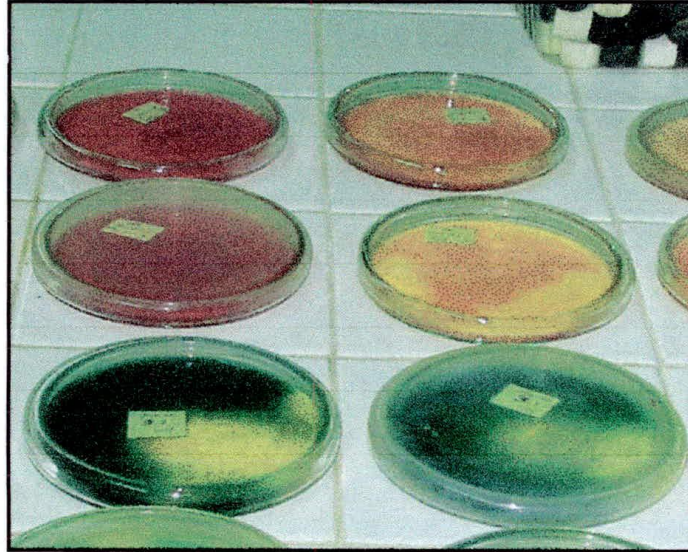
**Figura 3. Frotis de la piel de *Ariopsis bonillai* utilizando la plantilla y el escobillón para su posterior siembra en caldos de pre-enriquecimiento.**



**6.4.2 Fase de enriquecimiento.** De la fase de pre-enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas y se sembraron las diluciones  $10^3$  y  $10^4$ , por la técnica en superficie en los agares TCBS, MacConkey (MK), SS y Nutritivo (AN). En total se sembraron 160 cajas Petri (Figura 4), las cuales se incubaron a una temperatura de 35 a 37 °C durante 48 horas, y se caracterizaron macroscópicamente y microscópicamente las cepas aisladas.



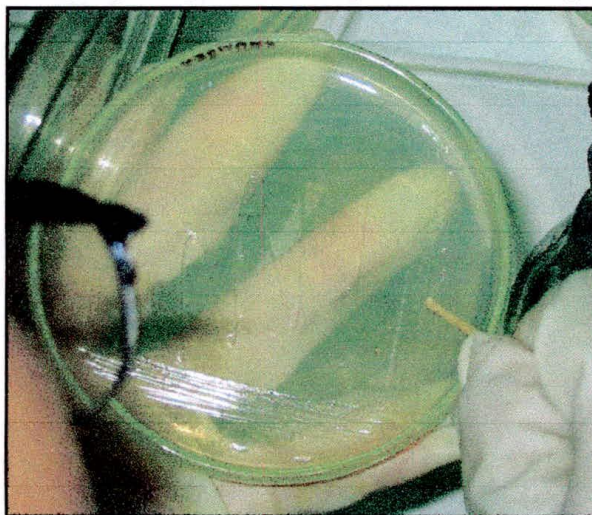
**Figura 4. Aspecto general de las colonias bacterianas aisladas en los medios de cultivos utilizados durante la investigación.**



**6.4.3 Aislamiento de colonias.** De cada caja de enriquecimiento, se realizaron pases sucesivos en agar nutritivo hasta obtener cepas puras por el método de agotamiento y se confirmó por coloración de Gram, luego se identificaron por medio de las pruebas bioquímicas (paneles de BBL Crystal para bacterias Gram positivas y Gram negativas) incubándose a una temperatura de 35 a 37 °C durante 18 a 24 horas.

**6.4.4 Identificación bioquímica.** A cada una de las cepas se le realizó la prueba de oxidasa, tomando una muestra de la cepa pura en Agar nutritivo con un palillo de madera (Figura 5), el cual se frotó sobre una tirilla indicadora (medición de oxidasa) para observar el viraje morado (positiva) (Figura 6) o amarillo (negativa), además, se les realizó la prueba de SIM (sulfuro, indol, motilidad)

**Figura 5. Extracción de cepas puras para realizar posteriormente la prueba de oxidasa.**



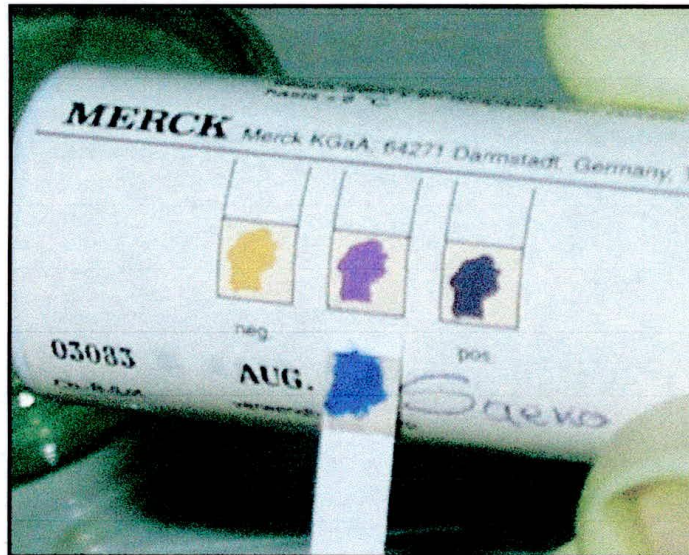
Con un asa redonda se extrajo de la caja Petri una colonia aislada, suspendiendo la muestra en un tubo con fluido de inculo de la prueba BBL Crystal, se tapó y agitó en un vórtex durante aproximadamente 10 a 15 segundos, se tomó la base de los paneles BBL Crystal, vertiéndose todo el contenido del fluido en el área objetivo de la base, alineando la tapa en cada uno de estos pocillos hasta que cada una de las puntas que contenían los sustratos deshidratados quedaran bien ubicados; esto para que se activara la reacción en contacto con el fluido. Se incubó a una temperatura de 35 a 37 °C, durante 18 a 24 horas.

**6.4.5 Lectura de los paneles BBL Crystal.** Después del período de incubación, los paneles con bacterias Gram negativas se leyeron boca abajo utilizando el visor del panel BBL Crystal, (Figura 7a) se consultó la tabla de colores (con luz blanca) de las reacciones (Figura 7b) realizándose una interpretación de éstas y se utilizó el cuaderno BBL

Crystal para registrar las reacciones.

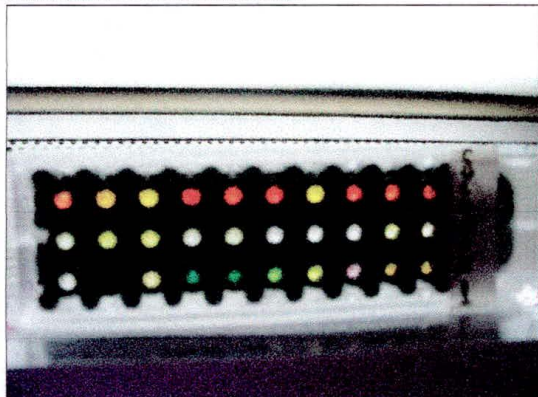
Los paneles con bacterias Gram positivas fueron leídos con una tabla de colores y una lámpara UV. Estos paneles tienen una celda de control negativo, se observaron con la lámpara UV el brillo de las otras celdas y se compararon con el control para determinar si eran positivos (más fluorescente que el control) o negativo (menos fluorescente).

**Figura 6. Prueba de oxidasa de especies bacterianas aisladas de la piel y del agua de las piletas para pruebas bioquímicas.**





**Figura 7. Panel de BBL Crystal utilizado para la identificación de especies bacterianas aisladas en el laboratorio.**



**(a) Panel de BBL Crystal**



**(b) Carta de colores**

**6.4.6 Cálculo del número del perfil BBL Crystal.** A cada resultado positivo del análisis, se le asignó un valor de 4, 2 ó 1, correspondiendo a la fila donde estuvo ubicado el análisis y un valor de 0 (cero) al resultado negativo. Se sumaron los números de cada reacción positiva en cada columna, generándose un número de diez dígitos que fue el número del perfil (Figura 8a y b), este junto con la morfología de Gram, indol y oxidasa fueron analizados mediante la utilización del software de códigos electrónicos del sistema BBL Crystal MIND, para obtener finalmente la identificación de la especie bacteriana aislada (Anexo a y b).



**Figura 8. Hoja de código para la identificación de BBL Crystal (a) Gram positiva (b) Gram negativa.**

**(a) Gram-Positive ID System / GP 陽性検査キット**  
 Cepa # 1 (Coco Gram+)  
 Result: 12  
 Identification: *Micrococcus sedentarius*  
 Validez biotipo: 1  
 Confianza: 99.73

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
2	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Result: 0 6 6 4 0 0 0 1 6 5

**(b) Enteric / Nonfermenter ID System / E/ NF 陽性検査キット**  
 Cepa # 2 (Bacilo Gram (-))  
 Result: 17  
 Identification: *Escherichia coli*  
 Validez biotipo: 1  
 Confianza: 99.9

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

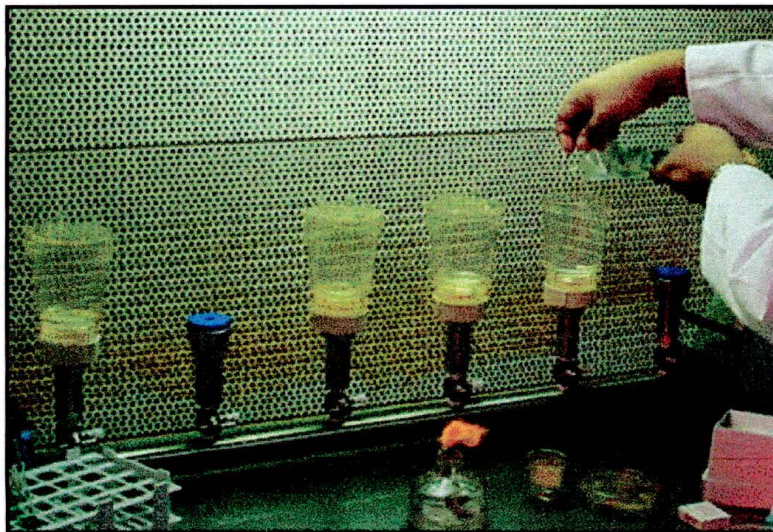
Result: 5 4 2 4 6 4 6 1 7 1

## 6.5 TÉCNICA DE SIEMBRA PARA EL AGUA.

A cada una de las cuatro piletas se les realizó un procedimiento que consistió en:

**6.5.1 Fase de pre-enriquecimiento.** Se tomó una muestra de 100 ml de agua de cada una de las piletas y se realizó filtración por membrana (Figura 9), de los filtros provenientes de esta filtración (8) cuatro fueron introducidos en cuatro frascos con 100 ml de agua peptonada alcalina (pH +/- 8.3) y los otros cuatros se introdujeron en cuatro frascos con agua peptonada a 0.1% (pH = 7), se marcaron con los números de las piletas, y se incubaron a una temperatura de 35 a 37 °C durante 48 horas.

**Figura 9. Filtración de las muestras de agua de las piletas y de la CGSM por el método de membrana.**



**6.5.2 Fase de enriquecimiento.** De la fase de pre-enriquecimiento se realizaron diluciones en base 10 ( $10^3$  y  $10^4$ ) para cada uno de los frascos, de cada dilución, se sembró (0.1 ml en superficie), por duplicado en cajas Petri con agar TCBS, MacConkey, SS, y Nutritivo, conformándose un total de 32 cajas las cuales se incubaron a una temperatura de 35 a 37 °C durante 48 horas, después de la incubación se procedió a caracterizar macro y microscópicamente las cepas encontradas.

**6.5.3 Aislamiento de colonias.** De cada caja de enriquecimiento, se aislaron cepas puras por el método de agotamiento en agar nutritivo y se incubaron a una temperatura de 35°C durante 18 horas. Para la identificación bioquímica se realizó el procedimiento descrito anteriormente (técnica de siembra para los peces).

Después de realizar el análisis microbiológico, los peces fueron devueltos a

sus respectivas piletas, continuándose el seguimiento diario a cada una de éstas, donde se observaba el comportamiento de los animales (ingesta de alimento, nado, etc.), 10 días después de iniciada la observación se realizó un nuevo análisis microbiológico y su correspondiente biometría, y así cada 10 días durante 3 meses para un total de 12 muestreos. Al final del experimento (después de tres meses) los peces fueron devueltos a la CGSM.

## **6.6 DISEÑO ESTADÍSTICO**

Con la información obtenida, se examinó la distribución de los datos haciendo uso de la estadística descriptiva (Canavos, 1994). Se realizó un análisis cuantitativo del UFC/ml utilizando varios métodos estadísticos, que permitieron analizar los parámetros que intervinieron en el experimento.

**6.6.1 Determinación de diferencias estadísticas.** Las pruebas estadísticas que se aplicaron al estudio fueron realizadas mediante el programa SPSS® versión 11.5, se utilizaron las rutinas de: comparación de dos muestras (tabla de contingencia) y Chi cuadrado para el muestreo del lote A, para los lotes (B y C) se efectuó una comparación de la carga bacteriana medida en UFC/ml entre los tratamientos profilácticos (con y sin tratamiento) del agua y de la piel de los peces, mediante un modelo anidado, que permitió la comparación entre estos para el muestreo de julio y agosto del 2004.

**6.6.2 Prueba de hipótesis (prueba pareada).** Otro análisis realizado fue



la comparación de muestras pareadas, utilizando el test de comprobación de hipótesis mediante la prueba de los signos, procedimiento efectuado en el programa STATGRAPHICS® versión 5.1 Statistical Graphics Corp. con el propósito de encontrar diferencias estadísticas entre las UFC/ml de las bacterias aisladas del agua con la piel de los peces.

**6.6.3 Análisis multivariados.** Para definir las asociaciones entre especies y los agrupamientos entre los medios de cultivos, tratamiento profiláctico y muestreo, se aplicaron dos técnicas de análisis multivariado: la clasificación jerárquica aglomerativa (análisis de clasificación - CLUSTER) y la técnica de ordenación conocida como escalamiento multidimensional (MDS); rutinas del programa PRIMER® 5 para Windows V 5.2.2. (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) (Carr, 1996).

## **6.7 VALIDACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA**

La confianza y los valores de biotipos de cada una de las especies bacterianas identificadas fueron halladas con el número del perfil mediante el software BBL Crystal de las pruebas bioquímicas.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 INFLUENCIA DEL SEXO EN EL NUMERO DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS

A los animales del lote A (mes de junio) se les efectuó un primer análisis buscando determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y el número de especies bacterianas encontradas en la piel; para esto se aplicó la prueba de Chi cuadrado (Tabla 1), mediante la cual se rechazó esta hipótesis ( $P > 0.10$ ); evidencia estadística que permite afirmar que el número de cepas bacterianas presentes en la piel no dependen del sexo, por ello, en los análisis siguientes se decidió no realizar diferenciación entre sexo.

**Tabla 1. Prueba de Chi-cuadrado para el lote A que determina la dependencia del número de cepas bacterianas presentes en la piel de *Ariopsis bonillai* de acuerdo al sexo.**

Concepto	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.797 <sup>(a)</sup>	6	0.937
Razón de verosimilitud	1.820	6	0.935
N de casos válidos	104	-	-

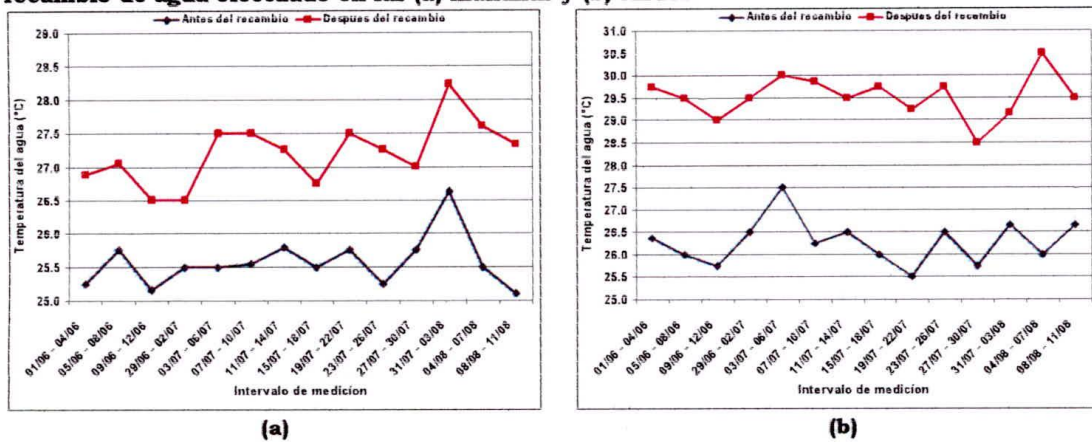
<sup>a</sup>cuatro casillas (28.6%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1.41.

### 7.2 FACTORES ABIÓTICOS MEDIDOS EN LAS PILETAS DURANTE EL ENSAYO (SALINIDAD Y TEMPERATURA)

La salinidad del agua fue siempre controlada y se mantuvo alrededor de 25 UPS; La temperatura tomada durante los tres meses de muestreo manifestó las mayores variaciones después del recambio del agua en horas de la mañana (26.0 a 28.5 °C) (Figura 10a), y antes del recambio en la tarde (29.0 a 30.5 °C) (Figura 10b) esto pudo ser causado por el calentamiento del agua de los tanques de recambio que se encontraban fuera del laboratorio y expuestos a la radiación solar. Santos *et al.*, (1995)

menciona esto como causa de estrés en los peces por la producción de corticoesteroides que reducen el sistema inmunológico de los individuos, señala además que temperaturas por debajo de la óptima, retrasa e incluso suprime la respuesta inmunológica de los individuos, la superior causa estrés o inmunosupresión, así mismo existe la respuesta diferencial de algunos patógenos a la temperatura.

**Figura 10. Comportamiento de la temperatura del agua de las piletas antes y después del recambio de agua efectuado en las (a) mañanas y (b) tardes.**



### 7.3 COMPORTAMIENTO DEL PESO Y TALLA PROMEDIO DE LOS ANIMALES DURANTE EL ENSAYO

El incremento en peso del lote B mostrado en la figura 11a. fue mayor entre los dos primeros muestreos (14 g); posteriormente, los animales mostraron una disminución en su peso de 88 a 87.5 g al finalizar el ensayo, mientras que la talla no se incrementó entre los dos muestreos iniciales, a partir de la fecha 11/07/2004, se observó un incremento de 1 cm alcanzando una talla final de 21.2 cm, entre esta fecha y el cuarto muestreo el crecimiento no fue sustancial (0.1 cm), lo que se relaciona con

las condiciones optimas suministradas, sin embargo en el ultimo muestreo los animales manifestaron inapetencia, lo que genero disminución en el peso de la población mostrando posiblemente los primeros síntomas de enfermedad.

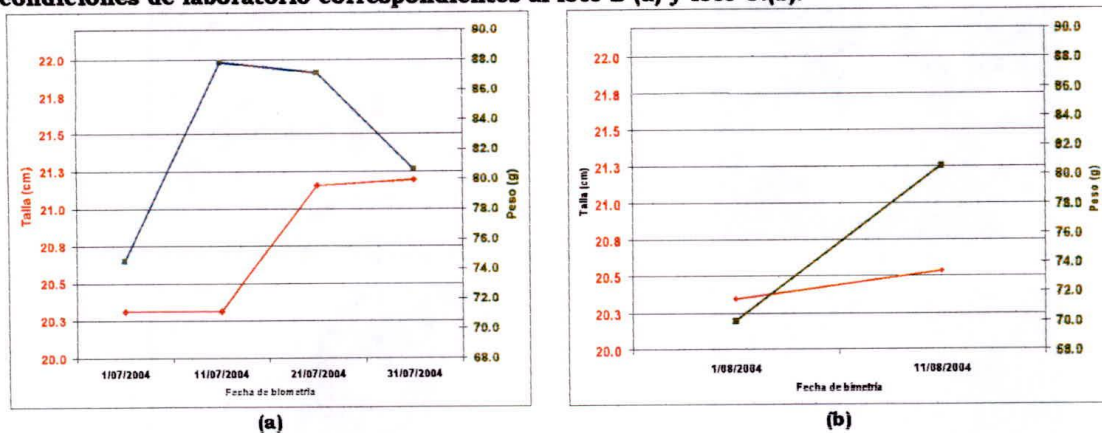
En el lote B el crecimiento de los animales en peso marco dos etapas claramente diferenciadas, inicialmente éste aumentó mientras la talla permaneció constante, situación común durante el crecimiento de organismos jóvenes, comportamiento que cambio en los últimos días del ensayo al reducirse bruscamente el peso, mientras que la talla disminuyo su incremento hasta un valor muy bajo, esta situación podría ser el síntoma del trastorno que estaba causando la presencia de las diferentes bacterias detectadas en el cuerpo del pez, que generalmente se evidencian por síntomas como inapetencia, coloración oscura de los tegumentos, lesiones congestivas y hemorragias internas y externas (Calderon *et al.*, 1999) que en ultimas disminuirían el estado de salud del animal ocasionando un bajo crecimiento especialmente en peso.

La figura 11b. muestra para el lote C el crecimiento en talla y peso de los ejemplares en un periodo de 10 días (01/08/2004 – 11/08/2004, posterior a este periodo los animales murieron) en donde se evidenció un incremento en peso de 10 g, mientras que el aumento de la talla no fue significativo, Santos, *et al.*, (1995). Manifiesta que la alimentación por lo menos una vez al día es importante, puesto que éste es un síntoma de buena salud y ayuda a determinar el estado de la población, aspecto decisivo a la hora de valorar las condiciones en las cuales el pez se encuentra.



La carencia de un número de biometrías más alto impide establecer si este comportamiento se presentó también en el lote C, sin embargo el peso de los animales de este lote con la misma talla del lote B fue menor, incrementándose esta diferencia al cabo de los 10 días iniciales del ensayo.

**Figura 11. Crecimiento en talla y peso promedio de los juveniles de *Ariopsis bonillai* en condiciones de laboratorio correspondientes al lote B (a) y lote C.(b).**



#### 7.4 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Se identificaron 12 especies bacterianas de las muestras de piel de los peces y del agua de las piletas, caracterizándose bioquímicamente (Tabla 2) de la siguiente manera; *Aeromona hydrophila*, *Bacillus pumilus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus sedentarius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio metschnikovii* a las cuales se les determino las características (Tabla 2 y Figura 12) y microscópicas (Tabla 3 y 12) En la Tabla 3 la morfología determinó dos grupos, los cocos con coloración de Gram positiva y los bacilos con Gram positivo y negativo. La figura 12 (b y d) muestra la apariencia macroscópica de las dos formas (irregular y redonda)



**Tabla 2. Características macroscópicas de las cepas aisladas de la piel de *Ariopsis bonillai* y del agua en condiciones de laboratorio.**

Cepa	Tamaño	Forma	Margen	Superficie	Elevación	Color	Consistencia
<i>Aeromona hydrophila</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Convexa	Beige	Cremosa
<i>Bacillus circulans</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Plana	Crema	Cremosa
<i>Bacillus licheniformis</i>	3 mm	Irregular	Lanoso	Opaca	Plana	Blanco hueso	Cremosa
<i>Bacillus pumilus</i>	2 mm	Redonda	Entero	Brillante	Convexa	Beige	Mantecosa
<i>Citrobacter freundii</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Convexa	Crema	Cremosa
<i>Corynebacterium bovis</i>	4 mm	Irregular	Ramificado	Brillante	Abultada	Beige	Cremosa
<i>Escherichia coli</i>	2 mm	Redonda	Entero	Brillante	Convexa	Crema	Cremosa
<i>Enterococcus faecium</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Embonada	Crema	Mucosa
<i>Micrococcus sedentarius</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Convexa	Beige	Cremosa
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Convexa	Crema	Mucosa
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Convexa	Beige	Cremosa
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1 mm	Redonda	Entero	Brillante	Plana	Beige	Cremosa

**Tabla 3. Características microscópicas de las cepas aisladas de la piel de *Ariopsis bonillai* y el agua en condiciones de laboratorio.**

Cepa	Morfología	Coloración Gram
<i>Aeromona hydrophila</i>	Bacilos	Negativo
<i>Bacillus circulans</i>	Bacilos	Positivo
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilos	Positivo
<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilos	Positivo
<i>Citrobacter freundii</i>	Bacilos	Negativo
<i>Corynebacterium bovis</i>	Bacilos	Positivo
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos	Negativo
<i>Enterococcus faecium</i>	Coco	Positivo
<i>Micrococcus sedentarius</i>	Coco	Positivo
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacilos	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco	Positivo
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Bacilos	Negativo

## 7.5 COMPARACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA ENTRE LA PIEL Y AGUA DE PILETAS

La hipótesis acerca de la semejanza entre las especies bacterianas aisladas de la piel con las encontradas en el agua de las piletas no se rechaza con un valor de prueba de 0.05, al existir evidencia estadística para afirmar que la carga bacteriana de la piel de los peces corresponde a la del medio circundante en los dos lotes analizados, así mismo el análisis de los medios de cultivos (AN, SS y TCBS) arrojó que no hay diferencias entre las muestras (Tabla 4 y 5).

**Tabla 4. Tipo III de contrastes de efectos fijos(a) para el lote B realizado en el programa Statgraphics® versión 5.1**

Muestreo	Fecha	Sig
Agua de la ciénaga - piel	01-Jul-05	1,000
	11-Jul-05	0,751
Agua de las piletas - piel	21-Jul-05	0.723
	31-Jul-05	0.999

**Tabla 5. Tipo III de contrastes de efectos fijos(a) para el lote C realizado en el programa Statgraphics® versión 5.1**

Muestreo	Fecha	Sig
Agua de la ciénaga - piel	1-Ago-05	1,000
Agua de las piletas - piel	11-Ago-05	0.999

## 7.6 ANÁLISIS MULTIVARIADO

Se identificaron dos grupos caracterizados por el Lote (1 Lote B y 2 el C) a un nivel del 22% de similaridad (Figura 13a), dentro de cada grupo son evidentes las diferencias, en el grupo 1 se inician aproximadamente al 30% haciéndose más visibles al llegar a 90%, donde las semejanzas son pocas distribuyéndose las muestras en cuatro grupos, abarcando 23 muestras para el lote C, en relación a los 25 del lote B.

El Lote C su similaridad llega hasta el 40% en donde se observan 2 grupos claramente diferenciados comparándolos con el lote B al mismo nivel de similaridad.

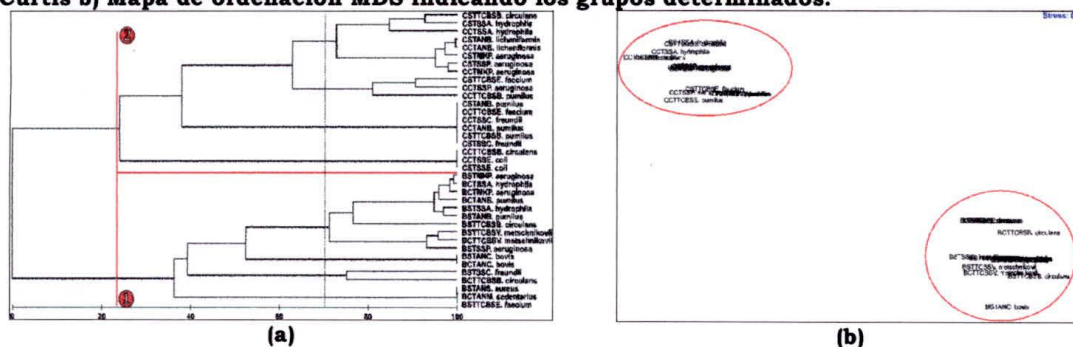
**Figura 13. Análisis de similaridad del número total de UFC/ml de muestras obtenidas de la piel de *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945) en condiciones de laboratorio. a) Dendrograma de clasificación de Bray Curtis b) Mapa de ordenación MDS indicando los grupos determinados.**



Dos grupos fueron caracterizados por el lote de donde provenían las muestras (1 Lote B y 2 el C) con una similaridad del 22% (Figura 14a). Analizando cada grupo identificado, son visibles sus semejanzas a partir del 70% de similaridad donde estas finalmente determinan grupos que no son semejantes a los observados en la figura 13. En la figura 13 y 14 (b) se observan dos grupos en las muestras de la piel y agua a partir del lote muestreado (a y b). La diversidad entre las muestras utilizadas en los análisis de similaridad tomando en cuenta los factores (medio de cultivo, tratamiento y tipo de muestra), sugiere que la interacción entre estos enmascara su influencia haciendo imposible discernir más allá del efecto del lote sobre la agrupación mostrada en las figura 13 y 14.



**Figura 14. Análisis de similitud del número total de UFC/ml de muestras obtenidas del agua de las piletas en condiciones de laboratorio. a) Dendograma de clasificación de Bray Curtis b) Mapa de ordenación MDS indicando los grupos determinados.**



## 7.7 COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

Mediante un análisis de varianza anidado se evaluó el efecto del tratamiento sobre las cepas bacterianas aisladas, estableciéndose que no existen diferencias estadísticas entre el tratamiento profiláctico aplicado a las muestras estudiadas (Piel y agua de las piletas) para el lote B y lote C (Tablas 6 y 7).

**Tabla 6. Test de comprobación de hipótesis, mediante la prueba de los signos de muestras pareadas para el lote B, analizando muestras de la Piel y Agua de las piletas para cada uno de los medios de cultivo.**

Medios de cultivo	Tratamiento	Valor P
AN	CT	0.0736
	ST	0.0736
SS	CT	0.1336
	ST	0.1336
TCBS	CT	0.1336
	ST	0.1336

**Tabla 7. Test de comprobación de hipótesis, mediante la prueba de los signos de muestras pareadas para el lote C, analizando muestras de la Piel y Agua de las piletas para cada uno de los medios de cultivo.**

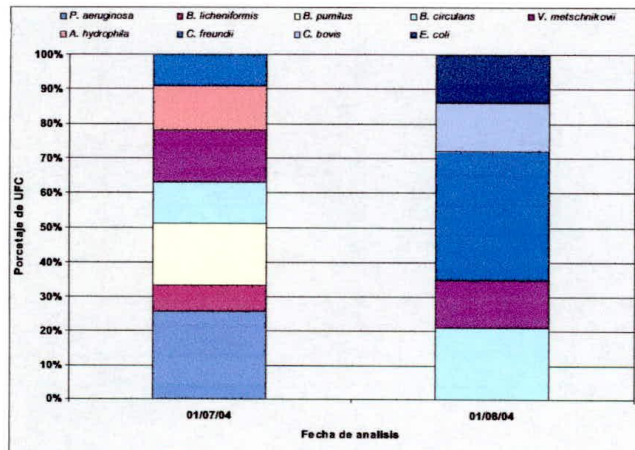
Medios de cultivo	Tratamiento	Valor P
AN	CT	0.2482
	ST	0.2482
SS	CT	0.1336
	ST	0.1336
TCBS	CT	0.2482
	ST	0.6170



## 7.8 ANÁLISIS DE LAS CEPAS PROVENIENTES DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS (PIEL Y AGUA)

**7.8.1 Identificación de las cepas bacterianas en el agua CGSM.** Las cepas bacterianas identificadas de las muestras de agua de la CGSM, mostraron una gran variedad entre las fechas de captura de los animales, Lote B (01/07/04) y C (01/08/04) (Figura 15) determinándose 7 especies para el lote B y 5 para el C, estando siempre presentes *Citrobacter freundii*, *Vibrio metschnikovii* y *Bacillus circulans* (Figura 15).

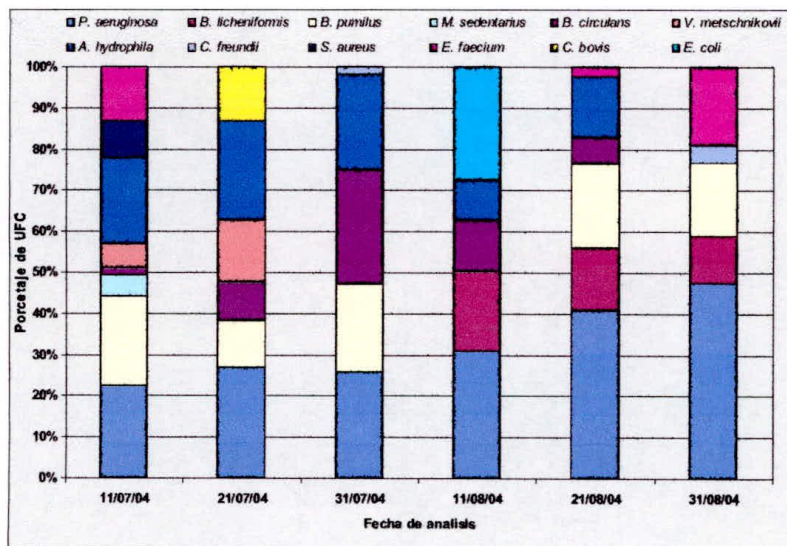
**Figura 15. Composición porcentual del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de la Ciénaga Grande de Santa Marta, efectuados en julio y agosto**



Considerando el porcentaje de UFC/ml durante los seis muestreos (Figura 16), se observa que el agua de las piletas analizadas indicaron la presencia constante de *Pseudomona aeruginosa* desde 22% al inicio al 48% final posiblemente por ser un microorganismo ubicuo de ambientes húmedos. A diferencia de las especies *Escherichia coli* (28%), *Corynebacterium bovis* (12%), *Staphylococcus aureus* (8%) y

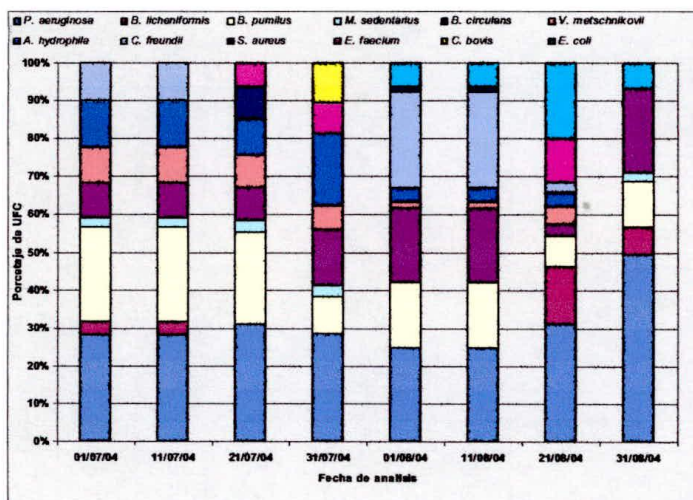
*Micrococcus sedentarius* (5%) que solo se presentaron en uno de los muestreos.

**Figura 16. Composición porcentual del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de las piletas durante los meses de julio - agosto 2004.**



**7.8.2 Identificación de las cepas bacterianas aisladas en la piel del *Ariopsis bonillai*.** El análisis de la piel mostró en la figura 17 la presencia de *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus circulans* como las especies más frecuentes y además las más abundantes entre un 40% y 83% del número total de UFC/ml detectadas, mientras que el *Corynebacterium bovis* (11%) fue únicamente registrado en un muestreo.

**Figura 17. Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas de la piel de *Ariopsis bonillai* durante los meses de julio y agosto 2004**



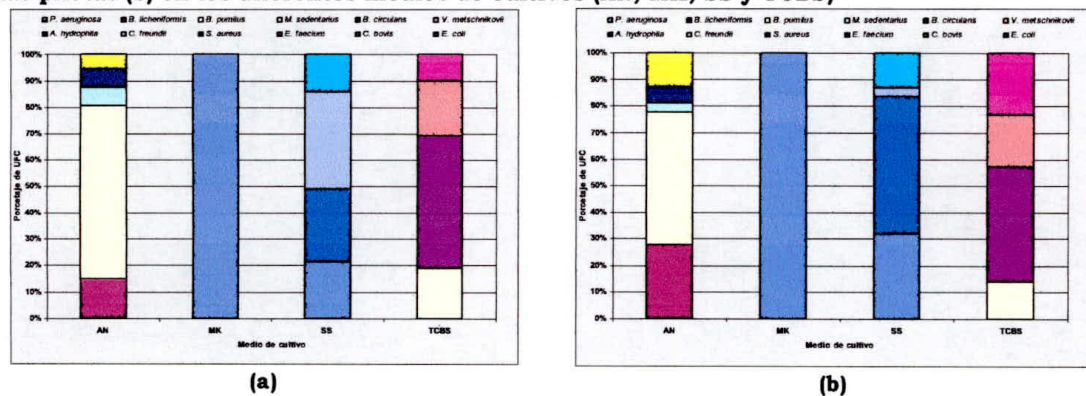
La figura 18 (a y b) mostraron amplias diferencias en la presencia de especies bacterianas por medios de cultivos, señalando a *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans* y *Citrobacter freundii* como las más abundantes, de los cuales el MK fue el más selectivo ya que permitió el crecimiento únicamente de la especie *Pseudomona aeruginosa*. Para las muestras de piel y agua, *Bacillus pumilus* en AN presentó en la piel un 67%, mientras que en el agua disminuyó a un 50%; *Bacillus circulans* varió entre un 50% y 40% en TCBS en las dos muestras mencionadas anteriormente; *Citrobacter freundii* hallado únicamente en SS con un 19% en la piel, disminuyendo a un 2% en el agua, siendo este el menor valor registrado para estas muestras.

Estos resultados son semejantes a los publicados en el Informe técnico Final del Monitoreo de la condiciones ambientales y los cambios estructurales y funcionales de las comunidades vegetales y de los recursos



pesqueros durante la rehabilitación de la CGSM, donde el *Staphylococcus sp.* y *Vibrio sp.* También fueron detectadas en las aguas de la CGSM entre 1998 y 2001 lo cual hace suponer que estos son organismos permanentes en el ecosistema, al poseer estas condiciones optimas para su desarrollo (salinidad moderada y presencia de materia fecal).

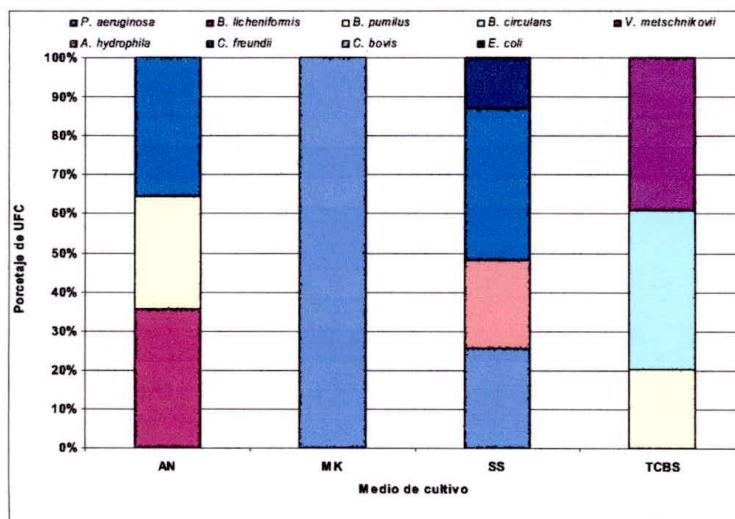
**Figura 18. Composición porcentual del número total de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas de la piel de *Ariopsis bonillai*, (a) y del agua de las piletas (b) en los diferentes medios de cultivos (AN, MK, SS y TCBS)**



La figura 19. muestra que *Pseudomona aeruginosa* se determinó en dos medios, MK con el 100% y SS con un 25%; tres especies se establecieron en AN (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* y *Citrobacter freundii*) con porcentajes cercanos a un 33%; para el TCBS fueron hallados dos especies que no habían sido registradas en otro medio para esta muestra, estas son (*Vibrio metschnikovii* y *Bacillus circulans*) con valores de 38% y 40%, respectivamente; además de *Bacillus pumilus* ya determinado para el AN con 20%, esto demuestra que la piel por estar en constante contacto con el medio es un lugar idóneo para la proliferación y ataque de las bacterias propiciando la aparición de una respuesta inflamatoria localizada (Toranzo, et al., 1995)

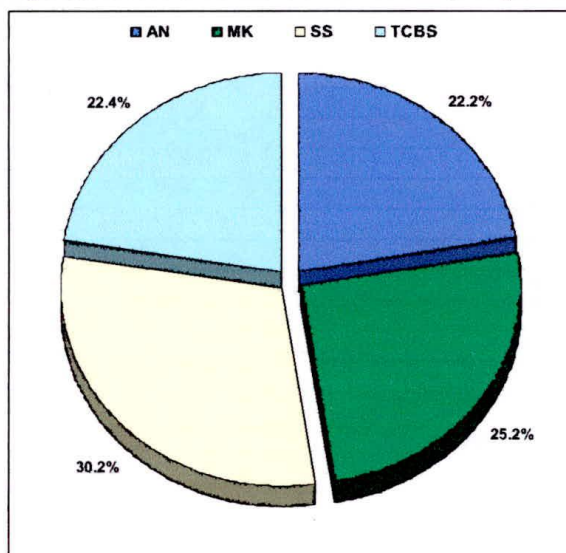


**Figura 19. Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de la Ciénaga en los diferentes medios de cultivos (Agar Nutritivo, MacConkey, SS Y TCBS).**



Los diferentes medios de cultivo empleados mostraron valores del número total de UFC/ml (Figura 20) entre el 30.2% en SS y 22.2% en AN, analizando los promedios de los diferentes muestras obtenidas del lote B y C se observa que estas no fueron similares entre este y el número UFC/ml, ya que el agar nutritivo contiene los elementos necesarios para la mayor recuperación de bacterias heterótrofas.

**Figura 20. Distribución porcentual del número total de UFC/ml por medio de cultivo**



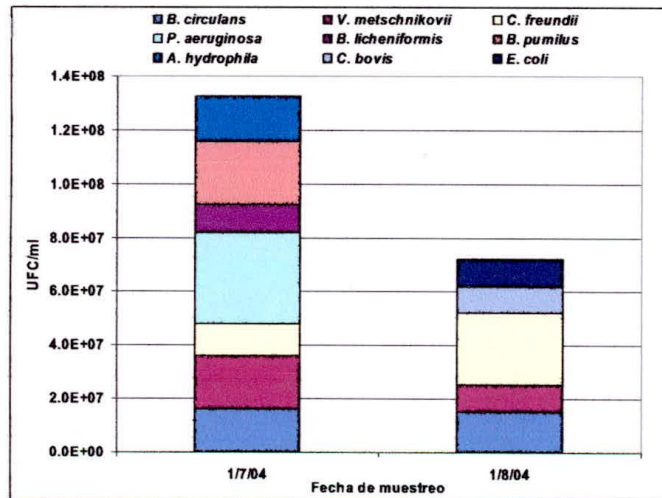
En los últimos años la técnica de recuento en placa de agar, ha sido cuestionada, ya que en los ambientes acuáticos, especialmente en estuarios, el número de bacterias detectadas no corresponde al total si no una fracción de este que no supera el 10% (Escobar, 1997) situación que debe ser analizada más cuidadosamente, especialmente si se considera que de estos sitios se extraen importantes recursos pesqueros que sirven de alimento al hombre, además de ser lugar de residencia para comunidades humanas generalmente de bajo nivel económico como lo son las poblaciones de Tasajera, Pueblo Viejo y Ciénaga entre otras que se hallan a orillas de la CGSM.

### **7.9 ABUNDANCIA DE LAS CEPAS AISLADAS DEL AGUA DE LA CGSM, PILETAS Y PIEL DEL CHIVO CABEZÓN.**

Se observa en la Figura 21 como el número de cepas aisladas y su

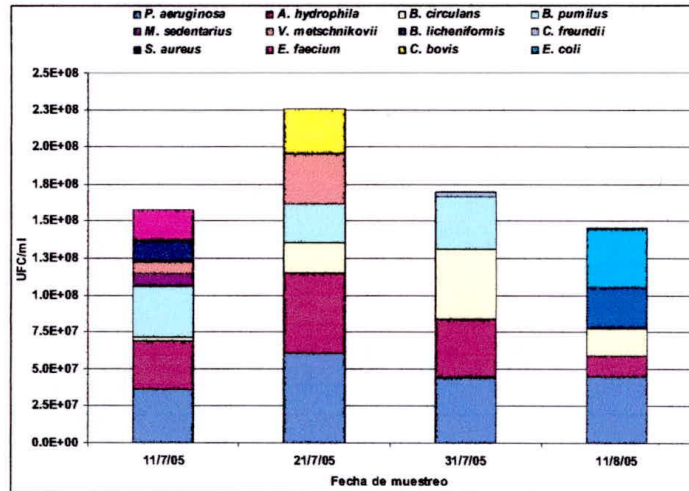
concentración total en UFC/ml varió ampliamente entre los dos muestreos efectuados en la CGSM, el primero muestreo presentó 1.3E+07 UFC/ml totales correspondientes a 7 especies mientras que el segundo, este total disminuyó un 49% (0.7E+07 UFC/ml ) y cinco especies; entre ambos muestreos solamente se presentaron tres cepas bacterianas en común (*B. pumilus*, *V. meschikovii* y *C. freundii*) representando estas entre el 47% y 81% del total por cada muestreo.

**Figura 21. Concentración de UFC/ml aislada de las muestras de agua de la Ciénaga Grande de Santa Marta**



Para las piletas se hallaron valores en promedio de 1.8 E+07 UFC/ml (Figura 22.) dentro del cual tres cepas permanecieron a lo largo de todos los muestreos (*P. aeruginosa*, *A. hydrophila* y *B. circulans*) variando su porcentaje variando el número de cepas bacterianas entre ocho del muestreo del 11/7/05 a cuatro el 11/08/05

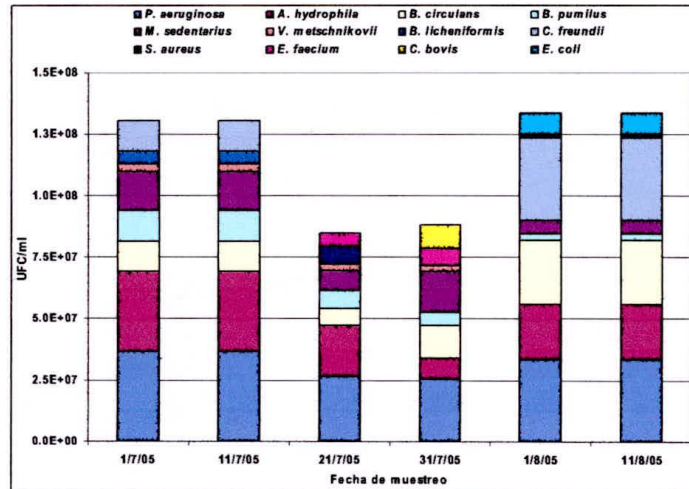
**Figura 22. Concentración de UFC/ml aislada de las muestras de agua de las piletas**



Los niveles de UFC/ml determinados para el frotis de la piel del chivo cabezón mostrados en la Figura 23 en promedio fue de  $1.1 \text{ E}+07$  UFC/ml presentando dos muestreos valores inferiores a los demás ( $8.2 \text{ E}+07$  UFC/ml) a nivel de cepas bacterianas fueron presentes siempre cinco cepas (*P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *C. bovis*, *B. circulans* y *C. pumilus*) dentro de las cuales (*P. aeruginosa*, *A. hydrophila* y *B. circulans*) también se habían registrado en las muestras de agua de CGSM conformando estas cinco cerca del 75% de total por fecha de muestreo. Además de lo anterior, la comparación entre las muestras antes de la aplicación del baño (01/07 y 01/08) y después (11/07 y 11/08) no disminuyeron el número de UFC/ml totales y por cepa bacteriana, indicando esto la ineficacia de un solo baño como tratamiento para controlar la carga de bacteriana patógena presente en la piel del chivo.



**Figura 23. Concentración de UFC/ml aislada de las muestras del frotis de la piel del Chivo cabezón**

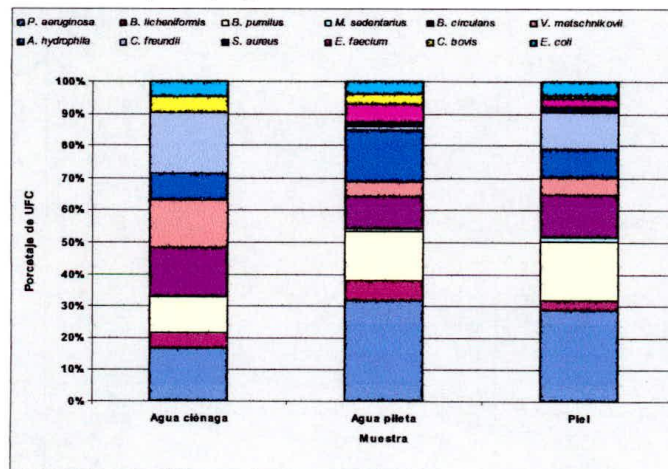


Analizando las tres figuras anteriores, inicialmente no se sería claro entender como en el agua de la CGSM posee un valor de UFC/ml menor que en el agua de las piletas, las cuales supuestamente debido a los recambios diarios del 75% con agua desinfectada con luz UV deberían ser asépticas, pero esta situación es fácilmente comprendida si se toma en cuenta la carga bacteriana presente en la piel del chivo cabezón (en promedio  $1.4 \times 10^7$ ) la que constantemente cede bacterias al agua de las piletas, ocasionando que los niveles de estas, aun con el recambio sean superiores a los determinados en la CGSM, que debido a que fueron tomadas del centro y sur de esta, donde la lejanía de centro urbanos haría pensar fácilmente en una mayor carga bacteriana en comparación con las zonas de donde se tomaron las muestras de agua.

## 7.10 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS CEPAS EN LAS MUESTRAS DE AGUA DE LA CIENAGA GRANDE DE SANTA MARTA

Las muestras del agua de la CGSM, agua de las piletas y de la piel, (figura 24) mostraron la presencia común de *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Vibrio metschnikovii*, *Aeromona hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium bovis* y *Escherichia coli*, como las más comunes a diferencia de *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus sedentarius* que presentaron los valores mas bajos (1%.) para el agua de las piletas y la piel.

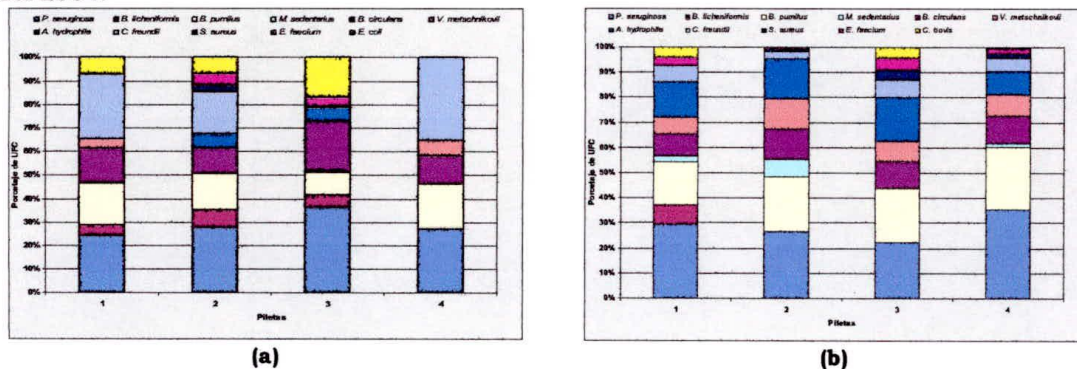
**Figura 24.** Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de la Ciénaga, agua de las piletas y la piel de *Ariopsis bonillai* durante los meses de julio y agosto del 2004.



De las 4 piletas analizadas en la figura 25a, tres especies fueron las más frecuentes, *Pseudomona aeruginosa* (24% a 36%), *Bacillus circulans* (10% a 20%) y *Bacillus pumilus* (11% a 22%), a diferencia de *Staphylococcus aureus* que se encontró en las piletas 2 y 3 con el menor

valor (0.5%). La figura 25b además de presentar las anteriores especies registró la presencia de cuatro nuevas, agrupando las siete anteriores como las más frecuentes al detectarse en todas las piletas, las cuales fueron *Vibrio metschnikovii* (5% a 12%), *Aeromona hydrophila* (10% a 16%), *Citrobacter freundii* (3% a 6%), y *Enterococcus faecium* (2% a 5%).

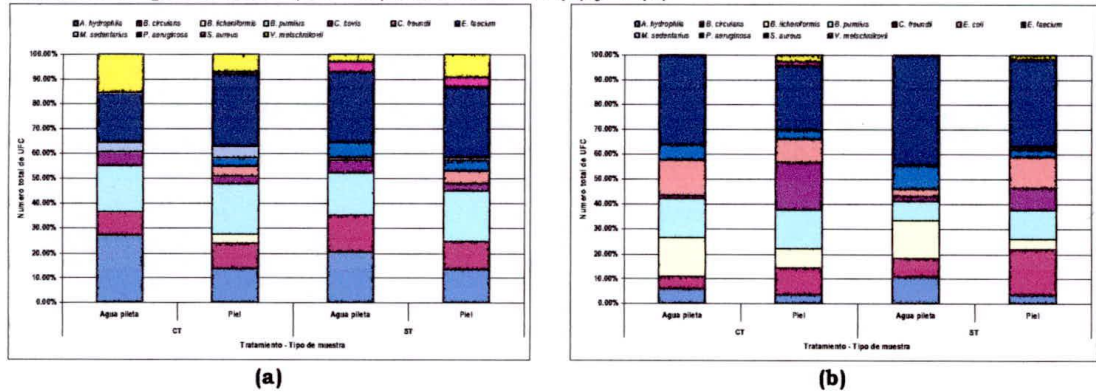
**Figura 25. Porcentajes del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de las piletas durante el mes de julio (a) y agosto (b) del 2004.**



La figura 25 (a y b) muestra una similitud en la diversidad de las especies aisladas y el número de UFC/ml, en el lote B son ligeras las diferencias comparando las muestras de piel y agua con y sin tratamiento (CT) y (ST), sin embargo dos especies salen de este patrón, *Bacillus licheniformis* (5%) detectada solamente en la piel CT y *Staphylococcus aureus* presente en ST para la piel y agua con valores de 7% y 3%; en el caso del lote C, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* aumentaron drásticamente su número, mientras que el resto de las especies disminuyeron, además *Bacillus licheniformis* detectado solo antes en la piel CT, se encontró ahora en todas las muestras con valores entre el 5% y 13%, *Staphylococcus aureus* se aisló solamente de la piel CT con un valor de 2%.



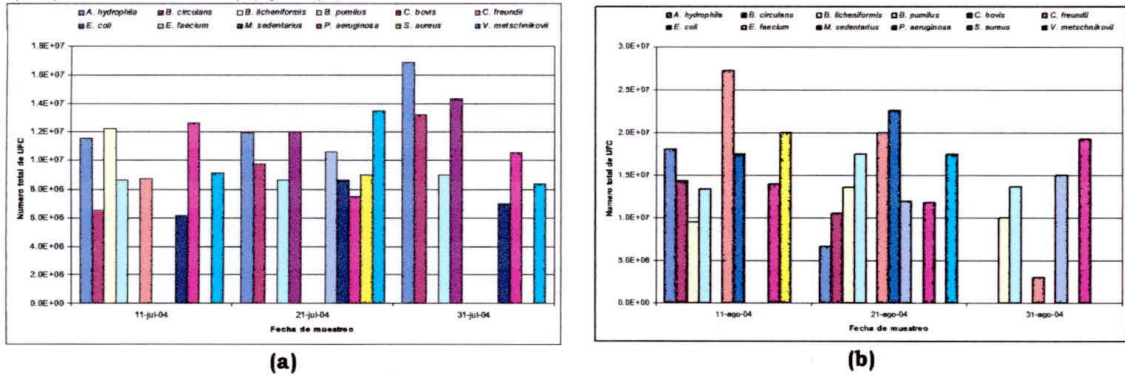
**Figura 26. Composición porcentual del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas del agua de las piletas y la piel con y sin la aplicación de tratamiento profiláctico (CT- ST) Para el lote B (a) y C (b)**



A través de la figura 26 (a y b) es visible un valor superior del UFC/ml en la mayoría de especies bacterianas en las muestras del lote B con respecto al C, especialmente durante el ultimo muestreo en donde, además el número de estas se redujo al pasar de 7 a 5; observando el lote B existe una gran variabilidad del número de UFC/ml presentándose tres comportamientos heterogéneos, el primero es el aumento progresivo del número de UFC/ml en *Aeromona hydrophila* y *Bacillus circulans*; la relativa estabilidad del *Bacillus pumilus* y la variabilidad de *Pseudomona aeruginosa*, *Micrococcus sedentarius* y *Vibrio metschnikovii* que no mostraron un patrón consistente, este ultimo comportamiento fue más generalizado en el lote C donde solamente el *Citrobacter freundii* presentó una tendencia a disminuir a diferencia de las demás especies que fueron variables en su comportamiento.

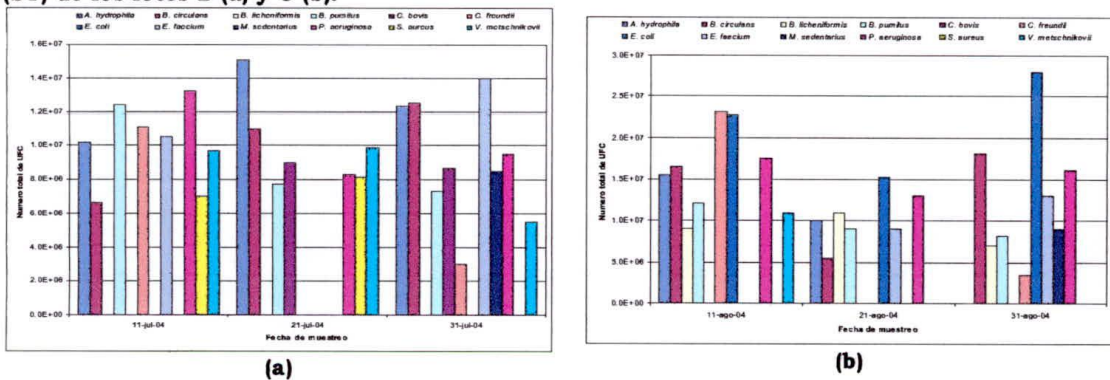


**Figura 27. Variación del número total de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas de las muestras con la aplicación de tratamiento profiláctico (CT) en los lotes B (a) y C (b).**



La figura 31 (a y b) muestra el mismo patrón observado en la figura anterior con respecto al UFC/ml, registrándose valores variables para cada especie bacteriana, sin embargo es visible una mayor variación dentro cada una durante los dos últimos muestreos para el lote B circunstancia observada también en el lote C, donde fue el segundo muestreo el de menor número de UFC/ml, no obstante es de resaltar la ausencia de *Staphylococcus aureus* en el lote C ST especie que fue registrada para el mismo lote CT.

**Figura 31. Variación del número total de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de las especies bacterianas aisladas de las muestras sin la aplicación de tratamiento profiláctico (ST) de los lotes B (a) y C (b).**



El tratamiento de enfermedades en los peces en nuestro medio carece de drogas específicamente elaboradas para su empleo en estos organismos, haciendo necesario recurrir a drogas empleadas en actividades agrícolas y en el tratamiento de enfermedades del hombre, para el control de cualquier enfermedad ocasionada por bacterias en los peces, pero aun en estos casos se debe considerar si el principio activo de la droga afectaría al pez u otros componentes del sistema acuático o a condiciones fisicoquímicas del agua además de los organismos causantes de su empleo (Muir, *et al.* 1994).

Aunque el sistema de defensa del *Ariopsis bonillai* permite que viva en equilibrio con las cepas presentes en el agua de la CGSM, el hecho de observarse síntomas de infección bacteriana indican que el animal esta sufriendo de una enfermedad que no puede combatir con sus propias defensas obligando a pensar en el uso de drogas.

### **7.11 LESIONES OBSERVADAS EN LA PIEL DEL CHIVO CABEZÓN**

La figura 28, exhibe las lesiones de la piel ocasionadas por las bacterias identificadas, resaltando las ulceraciones en el dorso del animal facilitadas por la carencia de escamas, situación que lo hace susceptible a este tipo de ataque, característica de importancia, ya que hace parte junto con la piel y membranas mucosas de la primera línea de defensa que limita la penetración del patógeno (López, 2001).

El estado general de la piel es uno de los principales indicadores de la salud de los peces, en investigaciones realizadas sobre patología de otras

especies de peces como la Lubina, Trucha y Salmón del Atlántico, la mayoría de las cepas bacterianas identificadas mostraron daños de importancia sobre la piel en forma de ulceraciones, heridas, sangrados, necrosis, etc. Que fueron evidencia inequívoca de infección bacteriana (Toranzo *et al.*, 2000).

**Figura 28. Lesiones externas de la piel del Chivo cabezón ocasionadas por bacterias**



Además de las lesiones en la piel, se observó que los animales nadaban raspando su cuerpo contra las paredes de las piletas, un claro indicio de infección bacteriana que acompañaron a otros síntomas (Tabla 10.).

**Tabla 10. Características externas de la piel de *Ariopsis bonillai* en el laboratorio**

<i>Ariopsis bonillai</i>	Características físicas
Pez sano	Color piel: negro con el vientre blanco Aletas: normales Natación: normal Ojos: normales Boca: normal
Pez con indicio de enfermedad	Color piel: gris opaco con manchas amarillas y hemorragia Aletas: necrosis y hemorragias superficiales Natación: lento con volteretas Ojos: hinchados con coloración blanca Boca: hemorragias superficiales
Pez enfermo	Color piel: blanco, desprendimiento de su piel y hemorragia Aletas: necrosadas y hemorragias Natación: errático Ojos: muy blanco y lanoso Boca: hemorragias superficiales



## 8. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias estadísticas entre el número de especies bacterianas y el sexo de los animales

La temperatura permaneció dentro de un rango estable a lo largo de toda la investigación, mostrando variaciones máximas de 2.5 °C en la mañana y 1.5 °C en la tarde, debido al efecto del calentamiento producido por el sol, estas coinciden con las condiciones habituales en la CGSM para el periodo analizado, por lo cual es posible pensar que este factor no causó algún grado de estrés en los peces, lo que favorecía favoreciendo la aparición de enfermedades de origen bacteriano.

El crecimiento expresado en talla y peso de los animales, mostraron un comportamiento anormal durante los últimos días, lo cual fue atribuido al efecto de las cepas bacterianas identificadas, ya que el alimento suministrado no vario en ningún momento del trabajo, pero la ingesta de los peces si mostró una disminución en los días finales.

La presencia de *Pseudomona aeruginosa*, demuestra que la calidad microbiológica del agua de las piletas estuvo fuertemente condicionada por la contaminación bacteriana presente en la CGSM, debido a que esta bacteria solo se presenta en ambientes altamente contaminados como lo es éste, siendo introducida a las piletas a través de los chivos, que conviven en equilibrio con estos microorganismos hasta que las condiciones favorezcan su proliferación, indicando esto un riesgo en la sanidad acuícola.

La existencia de las mismas especies de bacterias en las muestras analizadas de la piel del chivo y del agua, pueden indicar que estos son organismos que viven en el agua de la CGSM y sean adaptados a vivir sobre la piel del chivo.

Los porcentajes de UFC/ml por especie bacteriana entre los dos muestreos efectuados al agua de la CGSM, fueron muy variables, sugiriendo que deben existir factores posiblemente ambientales, que ocasionan cambios sobre las diferentes poblaciones bacterianas examinadas, respondiendo éstas con cambios rápidos en su tasa de reproducción y propagación, modificando continuamente la carga bacteriana presente en el agua de la CGSM.

La alta especificidad de los diferentes medios de cultivo sobre las bacterias, determinó más que el tipo de muestra y lote, el crecimiento de las bacterias identificadas, donde solo *B. pumilus*, *C. bovis* y *C. freundii* fueron registradas en dos medios de cultivo, en contraste, las restantes solo crecieron en su medio específico.

El porcentaje de UFC/ml de cada una de las doce especies de bacterias identificadas en las muestras de agua de las piletas y piel del chivo, fueron muy similares, lo cual indica que no se comportan de manera particular si se desarrollan en la piel del animal o en el agua donde estos nadan.

No se observaron diferencias entre el porcentaje de UFC/ml de las muestras tratadas con el tratamiento profiláctico de aquellas que no lo recibieron, por lo cual es posible pensar que el tratamiento efectuado no

surtieron el efecto deseado.

Las lesiones visibles causadas por la acción de las bacterias consistieron en; decoloración del dorso y comienzo de la aleta dorsal, ulceraciones y llagas.

La piel del chivo cabezon *Ariopsis bonillai* es un medio idóneo para retener una carga bacteriana importante que hace necesario efectuar tratamientos profilácticos permanentemente ya que sin ellos los animales se enfermarían.

Tres especies bacterianas fueron detectadas únicamente en la piel del chivo cabezón (*S. aureus*, *E. faecium* y *M. sedentarius*), las restantes nueve bacterianas fueron comunes a las muestras de la piel y agua tanto de la CGSM como de las piletas.

El factor decisivo en el análisis de similaridad fue el momento de la captura de los animales, ya que los lotes determinaron la agrupación de las muestras.

Es lógico pensar que las bacterias responsables de la enfermedad fueron (*P. aeruginosa*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *V. metschnikovii* y *A. hydrophila*), ya que permanecieron en todos los muestreos aumentando a medida que se realizaba la investigación señalando esto posiblemente su proliferación circunstancia que posiblemente determino la aparición de los síntomas de infección que al final llevaron a la muerte de los animales.



La muerte de los todos los animales del lote C después de 10 días de ensayo debe ser atribuida a la resistencia inmunológica de estos a un nivel de UFC/ml cercano a 800, valor pequeño en comparación con los 1700 UFC/ml presentes en el agua de las piletas de este lote.

La decoloración presentada en el dorso y el comienzo de la aleta dorsal, la ulceración y llagas fueron lesiones externas visibles causadas muy seguramente por la acción de las bacterias.

## 9. RECOMENDACIONES

Efectuar un análisis microbiológico de los animales, inmediatamente a su captura, para detectar las posibles especies bacterianas extrañas al animal en su medio natural introducidas por el contacto con el hombre.

Mejorar los procedimientos de limpieza y desinfección de los animales en el momento de su transporte o antes de depositarlos en las piletas buscando disminuir o controlar la carga bacteriana presente en ellos.

Observar críticamente el comportamiento de los animales a fin de identificar de forma temprana aquellos que por sus síntomas estén posiblemente afectados con una enfermedad contagiosa, para proceder a su aislamiento y posterior tratamiento.

Ensayar tratamientos profilácticos específicos para controlar las bacterias causantes de las enfermedades de los animales caracterizadas en este estudio, a fin de mejorar su calidad de vida, redundando en un mayor crecimiento en peso y talla a la vez que permitan asegurar la sobrevivencia de estos.

Debe estudiarse la posibilidad de trabajar con esta especie desde la etapa de alevinos por ejemplo debido a la poca susceptibilidad de estos al ataque de las bacterias. A fin de mantener esta alta resistencia en etapas posteriores e su desarrollo

Realizar investigaciones en otras especies de organismos acuáticos de la



CGSM, para efectuar la caracterización microbiológica de estos, a fin de identificar que tratamientos pueden aplicarse para controlar la carga bacteriana patógena de cada especie.

Este animal vive en la Ciénaga Grande de Santa Marta de forma aislada, comportamiento que podría ser un factor de estrés al encontrarse confinados varios en un recinto pequeño en comparación con su medio natural. Por lo cual debería determinarse si los animales en forma solitaria presentan una mayor resistencia a las enfermedades.

Efectuar tratamientos profilácticos de forma continuada, ya que este animal debido a su piel no ofrece una barrera eficiente que impida que las heridas externas se contaminen con facilidad, introduciendo bacterias al interior del animal.



## BIBLIOGRAFÍA

- Brown, L. 2002. Acuicultura para Veterinarios Producción y Clínica de Peces. Editorial ACRIBIA, S.A. España. 445p.
- Canavos, G. 1994. Probabilidad y Estadísticas. Aplicaciones y Métodos. Primera Edición McGraw-Hill, Madrid. 651p.
- Chaparro, N.; Gaitan, S.; Hernández, A. y Acero, A. 2002. Production of fingerlings of the New Granada sea catfish *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945) in laboratory and cages. Magdalena University- Colciencias. Santa Marta, inf. Final. 10-25p.
- Calderon, C.; Galan, A.; Hincapié, C. y Naranjo, A. 1999. Caracterización de los patógenos presentes en los sistemas de acuarios - Mundo Marino UJTL Santa Marta, Colombia. 170p.
- Carr, M.R. 1996. Primer user manual. (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research). Plymouth Marine Laboratory, UK, 41p.
- Del Puerto, C. A.; González, M. I.; Valdis, M.; Dominguez, I. 1992 Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en aguas. 30 p.
- Escobar, E. y Lara, O. 1997. Manual para la prevención y el tratamiento de enfermedades en peces de cultivo en agua dulce. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago de Chile, Chile. 286p.
- Galvis, O. D. 1984. Estimación del Crecimiento y Mortalidad del Chivo Cabeazón *Ariopsis bonillai* (MILES, 1945) en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. An. Inst. Inv. Mar. Punta de Betín, 14:67-84.

- Gómez, M. L. 1999. Condición Bacteriológica de la Mojarra Rayada *Eugerres plumieri* (Covier, 1830) en la Ciénaga Grande de Santa Marta. Santa Marta. Tesis de microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 130p.
- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T.; & Williams, S. T. 1995. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland. 787p.
- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T.; Williams, S. T. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth edition. Philadelphia. 787p.
- INVEMAR; BID; USL; CORPAMAG; GTZ; CIOH; UNAL. 2000. Monitoreo de las Condiciones Ambientales y los Cambios Estructurales y Funcionales de las Comunidades Vegetales y de los Recursos Pesqueros durante la Rehabilitación de la Ciénaga Grande de Santa Marta. Informe Técnico final. 264p.
- Kinkelin, P.; Michel, C. y Pierro, G. 1991. Tratado de Las Enfermedades De Los Peces. Editorial ACRIBIA, S.A. España. 353p.
- Microsoft 2005, Biblioteca Encarta 2005
- Klinke, R.H. 1982. Enfermedades de los peces. Editorial ACRIBIA, S.A. España. 507p.
- López, L. 2001. Monografía Sobre Patología de las Explotaciones Acuícolas Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR. 50p.
- Madigan, M. T.; Martínko, J. M. y Parker, J. 2004. Microbiología de los microorganismos. Pearson educación. S.A. Madrid, España. 1011p.
- Mejía, L. y Acero, A. 2002. Libro Rojo de Peces Marinas de Colombia. INVEMAR,



- Ministerio del Medio Ambiente, Instituto de Ciencias Naturales. 60-63p.
- Merck. 1994. Manual de medios de cultivos. 364p.
- Muir, J. 1994. Recent advance in aquaculture. Institute of aquaculture Berlin, Alemania. 350p.
- Pillay, T. V. R. 1997. Acuicultura, principios y prácticas. Limusa, S.A. México. 699p.
- Rodríguez, H.; Daza, P. y Carrillo, M. 2001. Fundamentos de Acuicultura Continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Colombia. 423p
- Roberts, R. J. 1981. Patología de Los Peces. Ediciones MUNDI-PRENSA. Madrid. 366p.
- Santos, M. A. y Mancera, P. J. E. 1995. Los recursos pesqueros y la pesquería de la Ciénaga Grande de Santa Marta. Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín. INVEMAR. 1-10p.
- Santos, Y.; Pazos, F.; Bandín, I. y Toranzo, A. E. 1995. Analysis of antigens presents in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes 01, 02 and 03. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2493 -2498p.
- Toranzo, A. E., Santos, y Romalde, J. L. 1995. Prevención y control de enfermedades de impacto económico en acuicultura. Acta Seminario "Patología y Medio Ambiente". V Congreso Nacional de Acuicultura. Universidad Autónoma de Barcelona. 392p.
- Toranzo, P.; Dopazo, L. y Barja, L. 2000. Estado Actual de la Patología Bacteriana y Virica en piscicultura española. Departamento de Microbiología y



Parasitología. Facultad de Biología e Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago, Santiago de Compostela (ON-LINE) Available. 392p.

Toro, M. C., y Villa, F. A. 1983. Algunos Aspectos de la Vida de *Ariopsis bonillai* (Miles, 1945) en la Ciénaga de Tesca. Bogotá. 30p

Villanueva, M. 1994. Metodología para el Diagnóstico de Enfermedades en Peces. Ministerio de Agricultura, Instituto de Pesca y Acuicultura (INPA). Tumaco, Colombia. 260p

([www.monografias.com/trabajos/bactevet/bactevet.shtml](http://www.monografias.com/trabajos/bactevet/bactevet.shtml)). Biología de los microorganismos.



**Anexo a. Pruebas bioquímicas para la determinación de microorganismos Gram positivos aislados en la piel de *Ariopsis bonillai* y en el agua en condiciones laboratorio**

Código	Sustrato	<i>Bacillus</i> <i>circulans</i>	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> <i>pumilus</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>bovis</i>	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	<i>Micrococcus</i> <i>sedentarius</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aures</i>
FCT	Control fluorescente (-)	-	-	-	-	-	-	-
FGC	4MU-b-D-glucosido	+	+	+	-	+	-	-
FVA	L-valina-AMC	-	-	-	-	+	-	-
FPH	L-fenilalanina AMC	+	+	-	+	+	+	-
FGS	4MU-a-D-glucosido	-	-	-	-	-	+	-
FPY	L-ácido piroglutámico-AMC	+	+	-	-	+	-	+
FTR	L-triptofano-AMC	+	+	-	+	+	+	+
FAR	L-arginina-AMC	-	-	-	+	-	+	+
FGA	4MU-N-Acetil-b-D-glucosamina+	+	+	+	-	+	-	-
FHO	4MU-fosfato	-	+	+	+	-	+	+
FGN	4MU-b-D-glucorònido	-	-	-	-	-	-	-
FIS	L-Isoleucina-AMC	-	+	-	-	-	-	-
TRE	Trehalosa	+	+	+	-	+	-	-
LAC	Lactosa	+	+	-	-	+	-	-
MAB	Metil-a y b-glucòsido	+	+	+	-	+	-	+
SUC	Sacarosa	+	+	+	-	+	-	+
MNT	Manitol	+	+	+	-	+	-	+
MTT	Maltotriosa	+	+	-	-	+	-	+
ARA	Arabinosa	+	-	+	-	+	-	-
GLR	Glicerol	-	-	+	-	-	-	+
FRU	Fructosa	+	+	+	-	+	-	-
BGL	Glucòsido	+	+	+	-	+	-	+
PCE	Celobiòsido	+	+	+	-	+	-	-
PLN	Prolina y Leucina -p-nitronalide	-	+	+	+	+	+	-
PHO	p-n-p-fosfato	-	+	+	+	+	+	+
PAM	p-n-pa-D-maltòsido	+	+	-	-	+	+	+
PGO	ONPG p-n-pa-D-galactòsido	+	+	-	-	+	-	-
URE	Urea	-	-	-	-	-	+	-
ESC	Esculina	+	+	+	-	+	-	+
ARG	Argenina	-	+	+	+	+	+	+

**Anexo b. Pruebas bioquímicas para la determinación de microorganismos Gram negativos aislados en la piel de *Ariopsis bonillai* y en el agua en condiciones laboratorio.**

Código	Sustrato	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>
ARA	Arabinosa	+	+	+	-	-
PHO	p-nitrofenil fosfato	-	+	+	+	-
GGL	y-L-glutamil-p-nitroanilina	+	+	+	-	+
MNS	Manosa	-	+	-	-	+
BGL	p-nitrofenil α-β-glucosa	+	+	-	-	+
ESC	Esculina	+	+	-	-	+
SUC	Sucrosa	+	+	+	-	-
NPG	p-nitrofenil- β -galatosa	+	-	-	+	+
PHE	p-nitro-DL-fenilalanina	-	+	+	-	-
MEL	Melodiosa	-	-	-	+	-
PRO	Nitroanilina de prolina	+	+	-	+	-
URE	Urea	+	+	+	-	+
RHA	Ramnosa	-	+	+	-	-
BPH	p-nitrofenil bi-fosfato	+	-	-	+	-
GLY	Glicina	-	+	+	-	-
SOR	Sorbitol	-	-	-	-	-
BXY	p-nitrofenil xilosa	-	+	-	+	+
CIT	Citrato	+	+	+	-	-
MNT	Manitol	+	+	+	-	-
AAR	p-nitrofenil α-arabinosa	-	-	-	+	-
MLO	Malonato	-	-	-	-	-
ADO	Adonitol	-	-	-	-	-
PHC	p-nitrofenil fosforilcolina	+	+	+	+	+
TTC	Tetrazolio	+	+	+	-	-
GAL	Galactosa	-	-	+	-	-
GLR	p-nitrofenil β-glucorònido	-	+	+	+	-
ARG	Arginina	+	-	-	-	+
INO	Inositol	-	-	-	-	-
NAG	p-nitrofenil N-acetil glucosamina	+	+	+	+	+
LYS	Lisina	+	-	-	+	-
OXI	Oxidasa	+	-	+	-	-
IND	Indol	+	-	-	-	-

