

# ESTUDIO SOBRE VIBRIOS HALOFILICOS EN AGUAS DEL RIO DE LA PLATA. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS \*

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS.  
INSTITUTO DE CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS



Magdalena GIAVI\*\*

## RESUMEN

Teniendo en cuenta que el estuario del Río de la Plata presenta las características ecológicas tanto de salinidad nutrientes, temperaturas, etc. para el crecimiento del *Vibrio parahaemolyticus*; el presente trabajo tiene como fin el aislarlo de las aguas costeras en los meses de verano, donde la temperatura del agua supera los 20,5°C.

La obtención de cepas con características de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, en un porcentaje del 70% Kanagawa-positivas, presentes en muestras de 300 ml.; de aguas costeras, nos lleva a prestar atención y perfeccionar técnicas de contaje.

## SUMMARY

The Río de la Plata estuary has the ecological requirements for the growing of *V. parahaemolyticus*.

---

\* Trabajo realizado en el Inst. de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de Veterinaria. Universidad de la República Uruguay.

\*\* Dra. en Veterinaria. Asistente del Inst. de Ciencias Microbiológicas de la Fac. de Veterinaria. Ejecutora del Proyecto.

Inst. de Investigaciones Pesqueras. prof. Dr. Enrique Bertullo.

Inst. de Ciencias Microbiológicas. Prof. Dr. Carlos A. Quiñones Sowerby. Director.

The purpose of this survey is to isolate *V. ph.* from the shore waters during summer time, when the water temperature is above 20° C.

Isolates with the characteristics of *V. ph.* and *V. alg.* ing a percentage of 70% Kanagawa-positive, have led us to pay attention and develop special counting methods.

## INTRODUCCION

El género *Vibrio* está compuesto por varias especies, algunas muy conocidas como el *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, algunas de las cuales viven en el mar, y presentan carácter halofílico.

El *V. parahaemolyticus*, ocupa el primer lugar entre los vibrios halofílicos en relación a la patogenicidad para el hombre, siendo considerado causante de intoxicación alimentaria a partir de productos marinos.

*V. parahaemolyticus* = *V. ph.* *V. alginolyticus* = *V. alg.*

Muchos investigadores dedicados a problemas del mar, biólogos, higienistas y microbiólogos se han preocupado por la ecología y patogenicidad de este vibrio.

Los estudios sobre ecología de *V. ph.* efectuados por Kaneko, 1973.<sup>(13)</sup>, demuestran que este microorganismo es un contaminante habitual de aguas estuariales, habitat ideal por sus características de salinidad, pH, nutrientes y zooplanton.

Este microorganismo presenta un carácter cíclico; aparece en las aguas cuando la temperatura es superior a los 14° C, y cuando la temperatura desciende, solamente es factible hallarlo en el sedimento.

Paralelamente la incidencia patógena presenta también carácter cíclico. En el Japón durante los meses de verano, *V. ph.* es uno de los agentes principales de gastroenteritis a partir de pescado contaminado e insuficientemente cocido.

También han sido descritas diversas afecciones en personas que han estado en contacto con aguas contaminadas. Varios trabajos de autores de diversas partes del mundo lo describen como causante de conjuntivitis, otitis e infecciones dérmicas<sup>(3)</sup>

Sakazaki y Miyamoto<sup>(18)</sup> determinaron la existencia de una correlación entre la patogenicidad del V. ph. para el hombre y su poder hemolítico en medios especiales de agar sangre salado - Agar de Wagatsuma.<sup>(1)</sup>

Sakazaki comprobó que un 98% de las cepas provenientes de pacientes con diarreas eran hemolíticas y que sólo un 1% de las cepas de origen marino poseían esta característica.

Actualmente el comportamiento de las cepas halladas parece no seguir los índices citados. Twedt et al.<sup>(9)</sup>, 1970, comunica una mayor incidencia de cepas hemolíticas en muestras de agua y productos marinos. Por otra parte Colwell<sup>(19)</sup> afirma haber hallado cepas no hemolíticas enteropatógenas, así como Zen-yoji et al. (1970).<sup>(20)</sup>

En el Uruguay en Diciembre de 1976, el I.I.P. de la Facultad de Veterinaria comunica la presencia de V. ph. y V. alg. en contenido intestinal de peces costeros del Río de la Plata.

En Diciembre de 1980, se comienza un proyecto de investigación a los efectos de conocer si la presencia de dicho fenómeno puede representar un peligro potencial para la salud pública.

La presente comunicación constituye la primera etapa del proyecto.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Muestras**

Se obtuvieron de diferentes puntos de la costa uruguaya del Río de la Plata durante los meses Enero-Marzo de 1981.

Los lugares y características de las muestras se señalan en el Cuadro 1.

### **Procedimiento de muestreo.**

Las muestras de agua consistían en 300 ml. que se extrajeron por medio de botellas Van-Dorn, y eran transferidos a frascos estériles de color caramelo. Las muestras que no se trabajaron inmediatamente fueron mantenidas entre + 4 a + 8°C.

El muestreo se realizó a cargo del S.O.H.M.A. (Servicio de Oceanografía de la Armada) a bordo del buque "Pedro Campbell", que cuenta con el equipo necesario.

Las muestras obtenidas a partir de branquias de pescados, se extrajeron con hisopos estériles los cuales se colocaron en tubos con 10 ml. de caldo de enriquecimiento.<sup>(14)</sup>

Los especímenes procedían de pesca costera, refrigerados adecuadamente y en buen estado higiénico-sanitario y de frescura.

### **Análisis bacteriológicos**

Las muestras de agua de 300 ml. se filtraron a través de un equipo estéril SEITZ EKS1 de (2" de diámetro), utilizando un sistema de vacío convencional. Luego estos filtros se desmenuzan introduciéndolos en frascos de boca ancha que contenían 150 ml. de caldo de enriquecimiento. (peptona 1%, ClNa 3.5%, pH 8.4).

Las muestras de branquias de pescado sembradas en tubos con 10 ml. de caldo de enriquecimiento, al igual que las muestras anteriores se incubaron de 8 a 16 horas a 37° C. en atmósfera normal.

A partir del caldo de enriquecimiento se sembraron los siguientes medios: B.T.P Teepol<sup>(17)</sup>; B.B.T.<sup>(7)</sup>; y T.C.B.S. \*

Las colonias que en B.B.T. presentaban un color azul-verdoso con centro más oscuro junto con las amarillas más extendidas, se identificaron a fin de realizar una bioquímica sintética.

Este descarte primario se realizó sobre las siguientes características: morfología, presencia de motilidad, comportamiento en T.S.I.A., fermentación de la glucosa sin producción de gas, cito-cromo-oxidasa, carácter halofílico, y crecimiento a 42° C.

Los estudios completos realizados se encuentran en el Cuadro 2.

Se recuperaron 15 cepas cuyas características cumplen las normas dadas por la F.D.A.<sup>(6)</sup>, e I.C.M.S.F.<sup>(9)</sup>.

## **RESULTADOS**

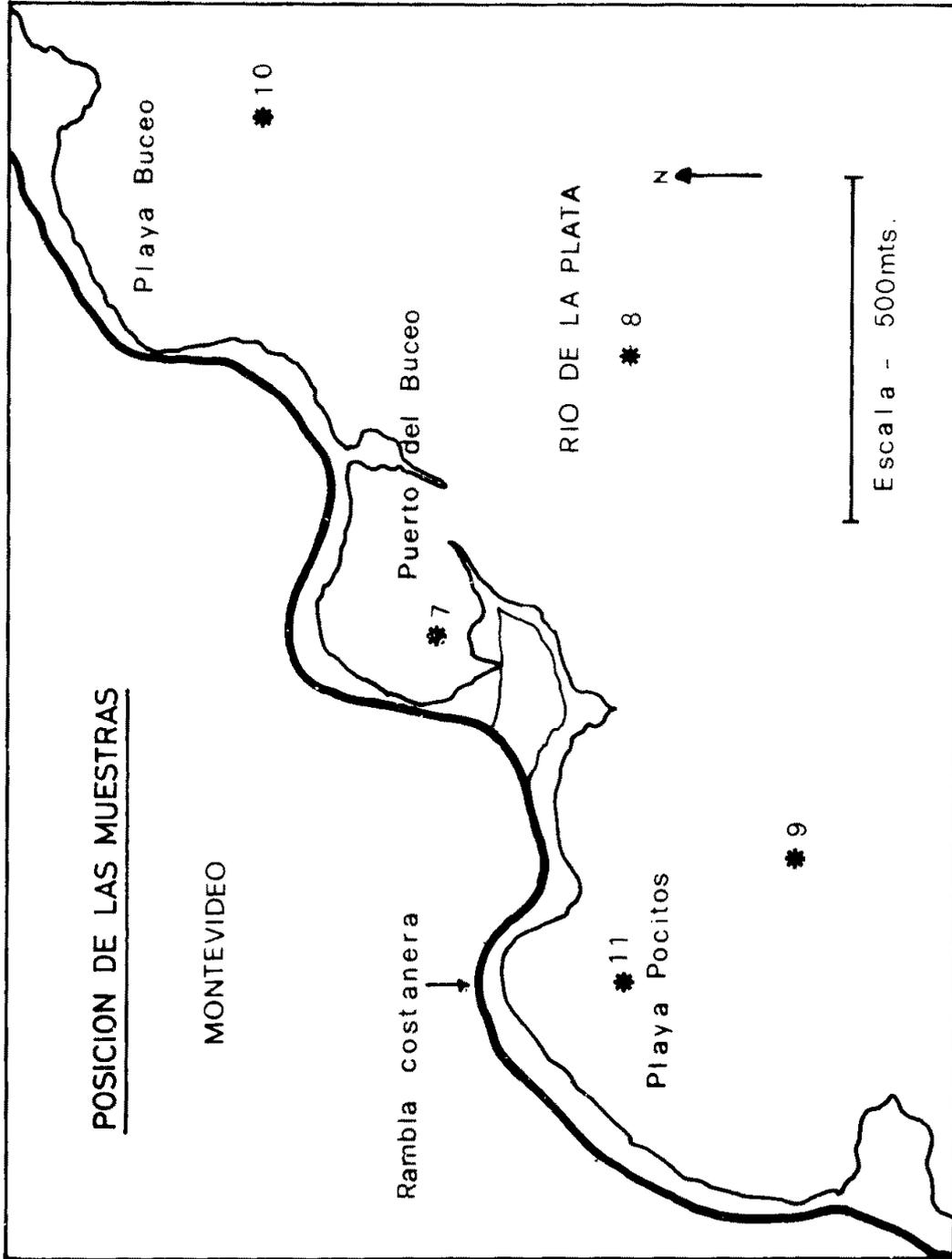
Ya que la finalidad era la obtención de cepas que cumplieran los requisitos primarios para la identificación como *V. ph.* y *V. alg.*, no se tuvieron en cuenta su concentración en agua, ni su relación con otros microorganismos.

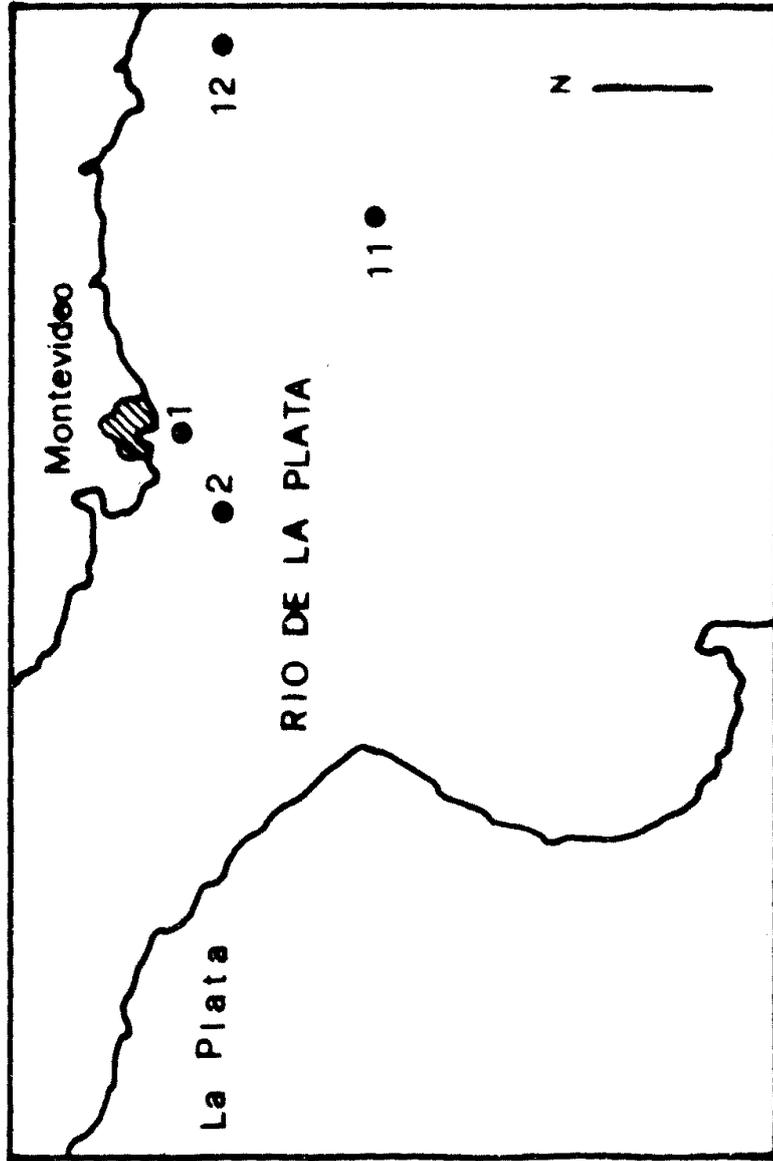
---

\*Thiosulfate Citrate Bile Sats Sucrose Agar. T.C.B.S.

**CUADRO I**

MUESTRAS	Fecha	T °C	S.o/oo	pH	Latitud	Longitud
1. Hisopo de branquias. Pargo blanco.	3/81					
2. Hisopo de branquias Corvina	3/1/81					
3. Agua. Orilla rocosa. Buceo	7/1/81	20.5	1.80	7.20		
4. Hisopo de branquias. Lisas.	8/1/81					
5. Hisopo de branquias. Corvina.	13/1/81					
6. Hisopo de branquias. Corvina.	17/1/81					
7. Agua del Puerto del Buceo.	20/1/81	2.43	0.92	7.70		
8. Agua frente al Buceo.	17/1/81	23.7	1.13	7.30	34°54'7	55°57'5
9. Agua frente a Playa Pocitos	17/1/81	23.7	1.45	7.50	34°54'9	55°58'3
10. Agua frente a Playa Buceo.	17/1/81	23.7	1.60	7.10	34°54'2	55°56'8
11. Agua de la Playa Pocitos.	26/1/81	23.2	1.25	7.90		
12. Agua de estación 1.	S.O.H.M.A. Cruce 001 Plan de contaminación del Río de la Plata 17/3/81	21.6	0.32	7.25	34°59'2	56°14'7
13. Agua de estación 2.		21.3	1.54	7.23	35°01'7	56°26'4
14. Agua de estación 11.		20.7	25.78	7.80	35°24'7	55°33'5
15. Agua de estación 12.		21.2	28.31	8.01	35°05'4	55°06'7





Posición de las Estaciones realizadas en el Crucero 001. S.O.H.M.A.

## CUADRO 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	V.ph
- Indol.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
- T.S.I.A	K/A	K/A	A/A	A/A	K/A	K/A	A/A	K/A	K/A	A/A	A/A	A/A	K/A	A/A	A/A	K/A
- SH <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Motilidad.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Hugh-Leifson (F)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Oxidasa.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Crec. 0% ClNa.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Crec. 7% ClNa.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Crec. 10% ClNa.	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
- Crec. 42° C.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Catalasa.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Rojo de Metilo.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
- Vogues-Proskauer.	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
- Citrato.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Gelatina.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Nitritos.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Urea.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Glucosa (Gas -)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Maltosa.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Manitol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Trehalosa.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Lactosa.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Ramnosa.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
- Xilosa.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Sorbitol.	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
- Sacarosa.	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
- Celobiosa.	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
- Arabinosa.	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
- Decarb. de Arginina.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Decarb. de Lisina.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Decarb. de Ornitina.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Tartrato.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Kanagawa test.	+	++	-	+	+	++	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-

En el descarte primario se desechó un 55% de las cepas estudiadas. Como puede observarse en el Cuadro 2, de las 15 cepas seleccionadas, 7 presentan características de *V. ph.* y 8 de *V. alg.*

Entre las características bioquímicas nos llamó la atención no haber obtenido cepas productoras de SH2 coincidiendo así con la bibliografía general citada; pero discrepando con trabajos realizados en el I.I.P. en 1977 y Casellas<sup>(3)</sup> donde señala la producción de SH2 por algunas cepas.

Se trabajó sobre medio de S.I.M. (Difco), lo que ratificaría lo comunicado por Casellas, quienes encuentran que se produce en medios adicionados con cistina y cisteína, y no en el medio S.I.M. (Difco).

Es importante destacar que solamente 4 muestras de las 15 muestras obtenidas, resultaron negativas a *V. ph.* y *V. alg.* Estas correspondían a las estaciones 3, 4, 14, 15.

## **DISCUSION**

Habida cuenta de los resultados, podemos afirmar categóricamente la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* en aguas marinas, a pocas millas de la costa y en nuestras playas.

La muestra 14 y 15, de las estaciones 11 y 12 donde existe un gran predominio de agua oceánicas resultaron negativas, ratificando lo comunicado por Colwell y Col. (1973) quienes no lo aislan en mar abierto.

Los estudios sobre patogenicidad realizados en Agar de Wagatsuma con eritrocitos humanos, demostraron una alta incidencia de cepas Kanagawa-positivas a pesar de provenir de agua, lo que indican que serían potencialmente patógenas de acuerdo al criterio de Kato y Col.<sup>(1)</sup>

Estos resultados concuerdan con Casellas<sup>(3)</sup> quienes encuentran cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* Kanagawa-positivas provenientes de mariscos argentinos, en un porcentaje del 100% y 36% respectivamente.

En el primer simposio Internacional de *V. parahaemolyticus*<sup>(8)</sup> se determinó que la vía de infección, con posteriores

cuadros diarreicos, es causada por ingestión de altos niveles como  $10^3$  a  $10^6$  de dicho microorganismo, los cuales por estudios en voluntarios humanos debían ser cepas Kanagawa-positivas.

Esto nos lleva a tener en cuenta los porcentajes encontrados, ya que dicho germen a pesar de ser sensible a altas ( $55^{\circ}$  C) y bajas temperaturas; tiene una gran velocidad de crecimiento, y se puede prestar a recontaminaciones o contaminaciones posteriores de otros alimentos a partir de productos marinos, útiles de trabajo y aguas contaminadas.

Colwel en 1977, quien ha estudiado profundamente el comportamiento del V. ph. realzó la importancia de los estudios sobre la presencia de este germen y su concentración en aguas, llegando a considerarlo indicador de posible peligro a la salud pública.<sup>(5)</sup>

En cuanto a niveles de contaminación en mariscos o peces estuariales, no hemos realizado trabajos, si bien creemos que pueden ser de interés. También es de destacar que nuestro volumen de pesca comercial se realiza en áreas de pesquería que no presentan las características estuariales para el crecimiento del V. ph.

## **CONCLUSIONES**

El presente trabajo, llevó a la determinación de continuar los estudios previstos sobre V. ph. en dos direcciones:

1) Estudios de su ecología, concentración y distribución en el Río de la Plata.

2) Estudio de la concentración de V. ph. en las playas, como eventual peligro para la salud pública.

Este punto implica estudios sobre la etiología de las típicas diarreas de verano en niños, a fin de determinar si pueden aislarse microorganismos similares a los hallados en el presente trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Br. Manuel Baruch. Ayudante del Inst. de Ciencias Microbiológicas, por su colaboración a la realización del proyecto.

Al Servicio de Oceanografía, Hidrografía y Meteorología de la Armada. S.O.H.M.A. por su participación en la recolección de muestras, y en especial al personal especializado del departamento de Oceanografía.

A Técnicos de ambos Inst. por su apoyo y colaboración prestada.

## BIBLIOGRAFIA

1. A.P.H.A. American Public Health Association. (1976). MORRIS, G.K.; M. FISHBEIN; J.A. BARROS etc. W.E. WITT. *Vibrio*, en: "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" Chapter 29: 358-369.
2. BARKER, W.H. Jr (1974) "Vibrio parahaemolyticus, outbreaks in the United States". *Lancet* I: 551-554.
3. CASELLAS, J.M.; CARIA, M.A.; GERGI, M.M. (1977). "Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus*, a partir de cholgas y mejillones en Argentina." *Rev. Asoc. Argentina de Microbiología*. 9 (2): 41-53.
4. COLWELL, R.R.; KANEKO, T.; STALEY, T. (1972) "*Vibrio parahaemolyticus*-Anestuarine bacterium resident in Chesapeake Bay." *Marine Technol. Soc. Food-Drugs. From the Sea Procc.* p. 87-94.
5. COLWELL, R.R.; KAPER, J. (1977). "Vibrio Species as Bacterial Indicators of Potential Health Hazard Associated with Water". A.W. Hoadley and B.J. Dutka, Eds., *American Society for Testing and Materials*, pp. 115-125.
6. F.D.A. food and Drug Administration. (1977). *Bacteriological Analytical Manual*. "Isolation and Identification of *Vibrio parahaemolyticus*". Chapter 9.
7. FEELEY, J.C.; BALOWS, A. (1974) "Vibrio". In *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd. ed., ed. E.H. Lennette, E.H. Spaulding, and J.P. Truant, p. 238. Washington, DC: American Society for Microbiology.
8. FUJINO, T.; SAKAGUCHI, G.; SAKAZAKI, R.; TAKEDA, Y. (1974). *Internacional Symposium on Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Co. Ltd. Tokyo, Japan.
9. I.C.M.S.F. (1978) *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*. "Microorganisms in Foods".
10. KANEKO, T.; WOLWELL, R.R. (1973). "Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay." *J. Bacteriol.* 113: 24-32.
11. KANEKO, T.; COLWELL, R.R. (1974). "Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods." *Appl. Microbiol.* 29: 269.
12. KANEKO, T.; COLWELL, R.R. (1975) "Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay." *Appl. Microbiol.* 30: 251-257.
13. KANEKO, T. (1973) "Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and related organisms in Chesapeake Bay". Ph. D. Thesis, Georgetown University.

14. KANEKO, T.; COLWELL, R.R. (1974) "Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and Related Organisms in the Atlantic Ocean of South Carolina and Georgia". *Appl. Microbiol.* 28: 1009-1017.
15. MOLENDÁ, J.R.; JOHNSON, W.G.; FISHBEIN, M.; WENTZ, B.; MEHLMAN, I.I.; DADISMAN, T.A. (1972) "*Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland. Laboratory aspects". *Appl. Microbiol.* 24: 444-448.
16. RAMOS, T.; BERTULLO, V.H.; GIAVI, M. (1978) "Vibrios halofílicos en peces béntonicos", en: *Seminario sobre Ecología y Sedimentación de la plataforma continental del Atlántico Sur*. UNESCO. Min. Educ. y Cult. (9-12 de mayo) Montevideo-Uruguay.
17. THATCHER, F.S.; CLARK, D.S. (1973) *Microorganisms in Food: Significance and Methods of Enumeration*. pp. 130-138. University of Toronto Press, Toronto, Canadá.
18. SAKAZAKI, R.; 1968b. "Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. 111. Enteropathogenicity. Japan. Y. Med. Sci. Biol. 21:325.
19. COLWELL, R.; SOCHARD, M.R.; (1977) "Toxin Isolation from a Kanagawa-Phenomenon Negative Strain of *Vibrio parahaemolyticus*". *Microbiol. Inmunol.* Vol. 21(5), 243-254.
20. ZEN-YOJI, H.; SAKAI, S.; and col. 1970 "Food poisoning due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle* 15:82.