

## Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México

REBECA VÁSQUEZ-YEOMANS\*

JORGE CÁCERES-MARTÍNEZ\*

ADRIÁN MAURICIO GARCÍA ORTEGA\*\*

**Resumen.** El ostión japonés, *Crassostrea gigas*, se cultiva en Bahía Falsa, Baja California, desde finales de los años setenta. En la actualidad existen 21 empresas dedicadas a esta actividad. A partir de 1998 se comenzaron a registrar mortalidades inusuales del ostión, alcanzando porcentajes mayores al 80% del total de la producción. Estos episodios de mortalidad se han mantenido de forma más o menos regular y la hipótesis de un posible agente patógeno involucrado, como un virus, una bacteria o ambos, permanece vigente. En el presente trabajo se registran los resultados de un estudio de caracterización fisiológica y bioquímica de bacterias aisladas de tejido branquial de ostiones recolectados durante un episodio de mortalidad en 2001. Se aislaron tres colonias de bacterias, dos de las cuales crecieron en el medio selectivo TCBS formando colonias amarillas que se identificaron como bacterias del género *Aeromonas*. La tercera cepa aislada no se pudo cultivar ni identificar. Las especies de *Aeromonas* no se documentan como patógenas para moluscos, pero sí para peces y reptiles. Por otro lado, la identificación de la colonia de bacterias de difícil crecimiento en medios empleados en este estudio, debe realizarse mediante métodos moleculares.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, *Aeromonas* sp., mortalidad, cultivo.

**Abstract.** Since the late 70s, the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, has been cultured in Bahía Falsa, Baja California, Mexico. Nowadays, there are 21 culture companies involved in this activity. In 1998, unusual mortality episodes of oysters began to occur, reaching up to 80% of the production. These mortality

\* Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos, Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Apartado postal 2732, 2280 Ensenada, Baja California, México.

\*\* Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California. Km. 1.5 Carretera a San Felipe, Ex-Ejido Xochimilco, 22310 Mexicali, Baja California, México.

episodes have been recurred up to date and, the hypothesis of a possible pathogen involved, such as a virus, bacteria or both, remains open. This work shows the results of a study on the physiological and biochemical characterization of isolated bacteria from gill tissue of oysters recollected during a mortality episode in 2001. Three colonies were isolated, two of them grew in TCBS selective medium, forming yellow colonies, which were identified as belonging to the genus *Aeromonas*. The third colony could not be cultured or identified. There are not records on the pathogenicity of *Aeromonas* spp. in mollusks; however, they have been reported as pathogenic for fishes and reptiles. Identification of the not cultured bacteria must be carry out by molecular methods.

Key words: *Crassostrea gigas*, *Aeromonas* sp., mortality, culture

## Introducción

El ostión japonés *Crassostrea gigas* es ampliamente cultivado alrededor del mundo. Esta especie ha sido introducida de su región de origen en Japón, a países como Australia, Francia, Holanda, España, Portugal, Tailandia, Estados Unidos y Reino Unido (Bardach *et al.* 1982; Edwards 1997). En 1973, *C. gigas* se introdujo en varias lagunas costeras de los estados de Sonora, Baja California Sur y Baja California, incluyendo Bahía Falsa, Baja California, México. En la actualidad, el cultivo de ostión en Baja California y en otros estados del noroeste de nuestro país está bien establecido, la producción anual es de unas 1 622 toneladas métricas anuales con un valor de 2.4 millones de dólares estadounidenses, y aproximadamente 1800 empleos sostienen esta actividad (*Anuario Estadístico de Pesca*, 2001) A partir de 1997, se comenzaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva de ostión, incluyendo semilla, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur. En abril de 1998, ocurrieron episodios similares de mortalidad en Bahía Falsa, Baja California. La alarma del sector se hizo patente y se realizaron tres reuniones de trabajo entre productores, autoridades acuícolas y académicos para tratar de determinar las causas de estas mortalidades y la forma de controlarlas. Las reuniones se realizaron en Sonora, Baja California y Baja California Sur, se determinó que entre las posibles causas asociadas con esas mortalidades estaban agentes patógenos (Cáceres-Martínez 2000).

En estudios histopatológicos llevados a cabo entre 1996 y 1998 en las zonas de cultivo del ostión japonés en Bahía Falsa, B. C., se encontraron en las branquias células polimórficas gigantes (Cáceres-Martínez 2000), mismas que están asociadas a la presencia de un iridovirus conocido como GNV (Gill Necrosis Virus o Virus de la Necrosis Branquial) (Comps 1988). Posteriores análisis histopatológicos de las branquias del ostión, iniciados en el verano de 2000, mostraron la sintomatología causada por el GNV, pero sin observar la presencia de células polimórficas asociadas al virus. Adicionalmente, análisis clínicos llevados a cabo en laboratorio y campo

mostraron en las branquias síntomas externos parecidos a los causados por el GNV (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2003); sin embargo, el estudio de estos tejidos usando microscopía electrónica no demostró la presencia del iridovirus GNV, pero sí presencia de bacterias tipo bacilos y de virus parecidos al herpes (Vásquez-Yeomans *et al.* 2004).

Estos resultados sugieren que tanto el virus parecido a herpes como las bacterias tipo bacilos que se encontraron, o ambos, podrían tener relación con los episodios de mortalidad observados. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar bacterias de tejido branquial del ostión japonés, *C. gigas*, recolectados durante un episodio de mortalidad en la Bahía Falsa, B. C.

### Materiales y métodos

Bahía Falsa está formada por un brazo de la bahía de San Quintín localizada en la costa del Pacífico de Baja California, entre  $30^{\circ} 24' N$  a  $30^{\circ} 30' N$  y  $115^{\circ} 57' O$  a  $116^{\circ} 01' O$  (Fig. 1) (Lara-Lara & Álvarez-Borrego 1975). La bahía tiene una longitud de 7 km y una profundidad máxima, en el canal principal, de 7 m; en toda la bahía se localizan los cultivos comerciales del ostión japonés

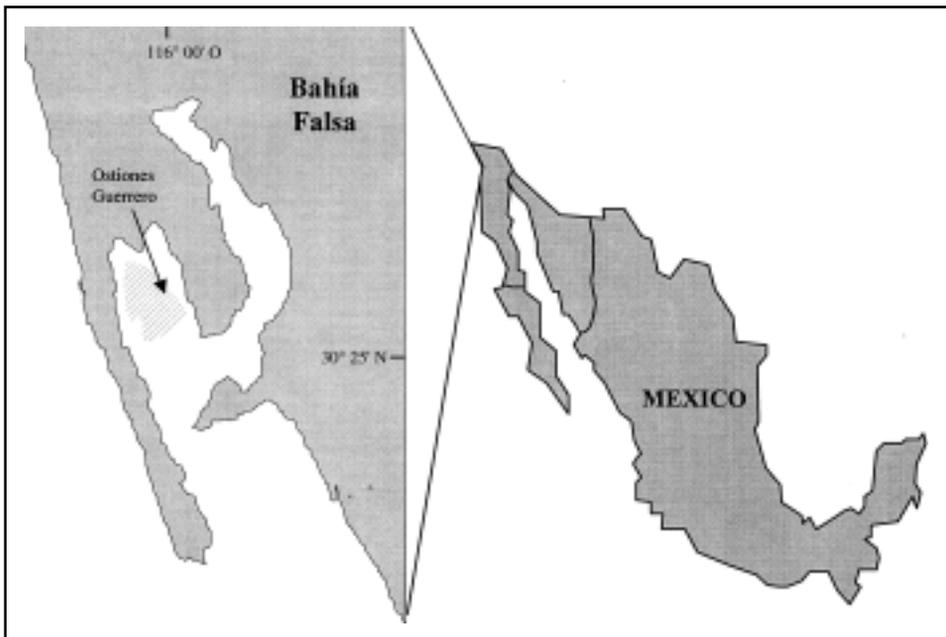


Fig. 1. Mapa de la Bahía Falsa en donde se señala el punto de recolecta de ostión. La zona sombreada corresponde a la zona de cultivo.

(Álvarez-Borrego *et al.* 1975). De una muestra de 70 ostiones adultos (longitud promedio de  $89.3 \pm 7.7$  mm) que se recolectaron en el área de cultivo, conocida como Ostiones Guerrero de Bahía Falsa (Fig. 1), para su análisis en el Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del C.I.C.E.S.E. durante un episodio de mortalidad, sólo 10 llegaron vivos.

De estos ostiones, y bajo condiciones asépticas, se obtuvieron 5 g de tejido branquial, el cual se homogeneizó con un mortero de porcelana previamente esterilizado. El homogeneizado se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave y se hicieron subsiguientes diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ). Se sembraron 10  $\mu$ l de la dilución  $10^{-4}$  en placas con medio de cultivo Zobell (Gibco). Éstas se incubaron a 26 °C por 24 horas. Las colonias dominantes se aislaron, una parte en medio TCBS y otras en medio agar marino.

La caracterización fenotípica se realizó por pruebas fisiológicas estándar (tinción de Gram, reacción de la oxidasa, morfología y movilidad, crecimiento en TCBS, fermentación de la glucosa, sensibilidad al agente vibriostático 0/129 y crecimiento a las salinidades 3% y 6%) y pruebas bioquímicas utilizando el API 20E (BioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando la solución de dilución con agua de mar estéril. Las bacterias aisladas e identificadas se preservaron a -70°C.

## Resultados

Se obtuvieron tres colonias de los aislamientos realizados de las branquias de los ostiones estudiados. Los resultados de la caracterización fisiológica y bioquímica de las bacterias aisladas se resumen en el Cuadro 1. Dos de las cepas crecieron en el medio selectivo TCBS formando colonias amarillas y se identificaron como bacterias del género *Aeromonas*. La tercera cepa aislada no se pudo identificar debido a su crecimiento muy lento, que no permitió obtener suficiente inóculo para su caracterización bioquímica con las pruebas del API 20E.

## Discusión

Durante los años sesenta y hasta la actualidad, en los cultivos de ostión japonés en diferentes partes del mundo, se han presentado mortalidades masivas durante los meses de verano, cuando la temperatura del agua excede los 20 °C (Friedman *et al.* 1991). La mayoría de los estudios enfocados a determinar la causa de estas mortalidades refieren a las bacterias como los posibles agentes causales. Entre las principales enfermedades ocasionadas por bacterias en *Crassostrea gigas* destacan la vibriosis (*Vibrio splendidus*, *Vibrio* spp.); nocardiosis (*Nocardia* sp., bacteria actinomiceta) y la enfermedad del ligamento de la charnela en juveniles de ostión

**Cuadro 1.** Caracterización fenotípica de las bacterias del género *Aeromonas*

<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>
Gram	-
Movilidad	+
Crecimiento en TCBS	+
Sensibilidad 0/129	-
Crecimiento NaCl 3%	+
Crecimiento NaCl 6%	+
Utilización de:	
Citrato	-
Glucosa	+
Manitol	+
Sorbitol	-
Ramnosa	-
Sacarosa	+
Melibiosa	+
Arnygdalina	+
Arabinosa	-
Enzimas:	
Hidrolisina ONPG	
Arginina dihidrolasa	+
Lisina descarboxilasa	-
Omitina descarboxilasa	-
Ureasa	-
Tryptófano desaminasa	-
Gelatinasa	+
Citocromo oxidasa	+
Producción de:	
H <sub>2</sub> S	-
Indol	+
Acetoína (Voges-Proskauer)	-
Oxidación de la glucosa	+
Fermentación de la glucosa	+

(bacteria parecida a *Cytophaga*) (Friedman *et al.* 1991, Bower *et al.* 1994; Lacoste *et al.* 2001).

Los resultados que se esperaban de los aislamientos y posterior identificación de las cepas bacterianas encontradas en el presente estudio, eran la presencia de algún tipo de bacteria patógena como las ya mencionadas. Sin embargo, las colonias que se encontraron fueron del género *Aeromonas* y, aunque análisis cualitativos de la flora bacteriana en ostión han confirmado la presencia de bacterias del género *Aeromonas* (Sugumar *et al.* 1998), este género no se documenta como patógeno para moluscos (McGladdery 1999). Sin embargo, sí hay registros de una elevada

patogenicidad de algunas de estas bacterias como *A. salmonicida* y *A. hydrophila* en peces, ranas, tortugas y otros reptiles (Hubbard 1981, Austin 1988).

Por otro lado, el lento crecimiento de la tercera colonia bacteriana, y por tanto la dificultad para obtener inóculos suficientes para las pruebas bioquímicas impidió su identificación y la posibilidad de determinar su posible patogenicidad. Es importante señalar que un método alternativo para identificación de bacterias en estos casos es a través de análisis molecular (Houpikian & Raoult 2002), lo que nos llevaría a conocer si ese tipo de bacterias pudieran ser identificadas como posibles patógenas. Si se descartan las bacterias encontradas como posibles agentes causales directos de las mortalidades en la bahía es probable que las partículas virales parecidas a herpes (Vásquez-Yeomans *et al.* 2004) sí lo sean, o que de alguna manera actúen de manera sinérgica con las bacterias. En cualquier caso, son necesarios mayores estudios a partir de la información aquí encontrada que permitan dilucidar el papel de estas bacterias y virus en las branquias del ostión japonés de la zona de estudio.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen la ayuda del oceanólogo Héctor González por proporcionarnos los organismos para este estudio. A la doctora Roxana Rico por sus sugerencias para el análisis bacteriológico. Este trabajo fue apoyado por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México a través del proyecto 623106 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

#### Literatura citada

- ÁLVAREZ-BORREGO, S., G. BALLESTEROS-GRIJALVA & A. CHEE-BARRAGÁN. 1975. Estudio de algunas variables fisicoquímicas superficiales en Bahía San Quintín, en verano, otoño e invierno. *Ciencias Marinas* 2 (2): 1-9.
- ANUARIO ESTADÍSTICO DE PESCA. 2001. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, D. F.
- BOWER, S. M., S. E. MCGLADDERY & I. M. PRICE. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* 4: 1199.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J. 2000. Resultados de los análisis patológicos efectuados a ostiones del Pacífico relacionados con mortalidades masivas. *Foro Regional sobre la Problemática del Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México*, 21 de enero, 2000. Hermosillo, Sonora.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J. & R. VÁSQUEZ-YEOMANS. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW Mexico. *Journal of Shellfish Research* 22 (3): 711-714.
- COMPS, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. In: W. S. Fisher (ed.) *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, Special publication 18, pp. 23-37.
- FELDHUSEN, F. 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* 2: 1651-1660.
- FRIEDMAN, C. S., J. H. BEATTIE, R. A. ELSTON & R. P. HEDRICK. 1991. Investigation of the relationship between the presence of a gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 94: 1-15.

- HOUPIKIAN, P. & D. RAOULT. 2002. Traditional and molecular, techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective. *Emerging Infectious Diseases* 8 (2): 121-131.
- HUBBARD, G. B. 1981. *Aeromonas hydrophila* infection in *Xenopus laevis* water borne bacillus. *Laboratory Animal Science* 31 (3): 297-300.
- JANDA, J. M. 1991. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Review* 4: 3 97-4 10.
- LACOSTE, A., F. JALABERT, S. K. MALHAM, A. CUEFF & S. A. POULET. 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oyster (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2304-2309.
- LARA-LARA, R. & S. ÁLVAREZ-BORREGO. 1975. Ciclo anual de clorofilas y producción orgánica primaria en Bahía San Quintín, Baja California. *Ciencias Marinas* 2 (1): 71-77.
- McGladdery, S. E. 1999. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). In: P. T. K. Woo & D. W. Bruno (eds.). *Fish diseases and disorders, vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections*. CAB International, London.
- SUGUMAR, G., T. NAKAI, Y. HIRATA, D. MATSUBARA & K. MUROGA. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* larvae. *Disease of Aquatic Organisms* 33 (2): 111-118.
- VÁSQUEZ-YEOMANS, R. & J. CÁCERES-MARTÍNEZ. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in Mexico. *Journal of Shellfish Research* 23 (1).

Recibido: 24.II.2004

Aceptado: 6.V.2004