



**CIOH**  
www.cioh.org.co

**ARTÍCULO**

## **Determinación de *Vibrio cholerae* en tanques de aguas de lastre de buques internacionales que arribaron al Terminal Multiboyas de Ecopetrol y al Puerto de Tumaco**

Fecha de recepción: 2011-07-26 / Fecha de aceptación: 2011-09-15

**Diana RODRÍGUEZ CUITIVA**, rodriguezcuitiva@gmail.com  
Dirección General Marítima, Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico, Área de Protección al Medio Marino.  
San Andrés de Tumaco, Nariño, Colombia.

### **RESUMEN**

Un vector importante de las especies acuáticas invasoras a las regiones costeras son las descargas de aguas de lastre de los buques, por el cual los microorganismos invasores pueden llegar a la región causando contaminación en la bahía. Por tal motivo se llevó a cabo una caracterización de las aguas de lastre de buques de tráfico internacional que arriban a Tumaco; realizando muestreos a 18 de ellos que arribaron al Terminal Multiboyas de Ecopetrol en esta bahía durante el periodo de febrero a octubre de 2010. En este ámbito se determinó si había *Vibrio cholerae* en estas aguas y de igual forma se hizo una caracterización físico-química de los tanques de aguas de lastre de los buques. Como resultado se comprobó que 12 buques registraron la presencia de *Vibrio cholerae*, lo que quiere decir que un 67% de los buques se encontraban por fuera del valor permitido (ausencia/100ml), por la Organización Marítima Internacional (IMO).

**Palabras claves:** Agua de lastre, buques, *Vibrio cholerae*, contaminación, salinidad.

### **ABSTRAC**

One of the prominent sources of aquatic invasive species to coastal regions, are the ballast waters discharged from ships, through which invading microorganisms can reach the bay regions, producing major contamination. For this reason, samples of the ballast water from the ships in international traffic that arrived in Tumaco were taken to identify the presence of microorganisms. The survey was conducted during the period from April to October 2010, in 48 ballast water tanks from the 18 ships that arrived at the Ecopetrol Buoyage Terminal in the Bay of Tumaco. In this universe, it was determined if there were *Vibrio cholerae* in these water samples and at the same time, it served to determine the physical-chemical conditions of the water ballast tanks of these ships. The result was that in 12 vessels the presence of *Vibrio cholerae* was confirmed, which means that 67% of the ships surpass the permissible level (absence/100ml), allowed by the International Maritime Organization (IMO).

**Key words:** Ballast water, ships, *Vibrio cholerae*, microbial contamination, salinity.

## INTRODUCCIÓN

El género *Vibrio*, es autóctono del medio acuático, principalmente de cuerpos de agua con un amplio rango de salinidad y suficientes nutrientes, son halófilos y algunos requieren al menos una concentración del 0,5% de NaCl en el medio para crecer, mientras que especies no halófilas como *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* y *Vibrio hispanicus*, puede crecer con concentraciones mínimas de sal [1].

*Vibrio cholerae*, es un bacilo *Gram* negativo anaerobio facultativo perteneciente al género *Vibrio*, de la familia *Vibrionaceae*; tiene forma de coma, es extremadamente móvil debido a su único flagelo polar, mide entre 0.2 y 0.4  $\mu\text{m}$  por 1.5 a 2.4  $\mu\text{m}$ , oxidasa positiva, catalasa positiva, capaces de reducir nitrato a nitrito, pueden descarboxilar la lisina y la ornitina y fermentar algunos carbohidratos con producción de ácido [2].

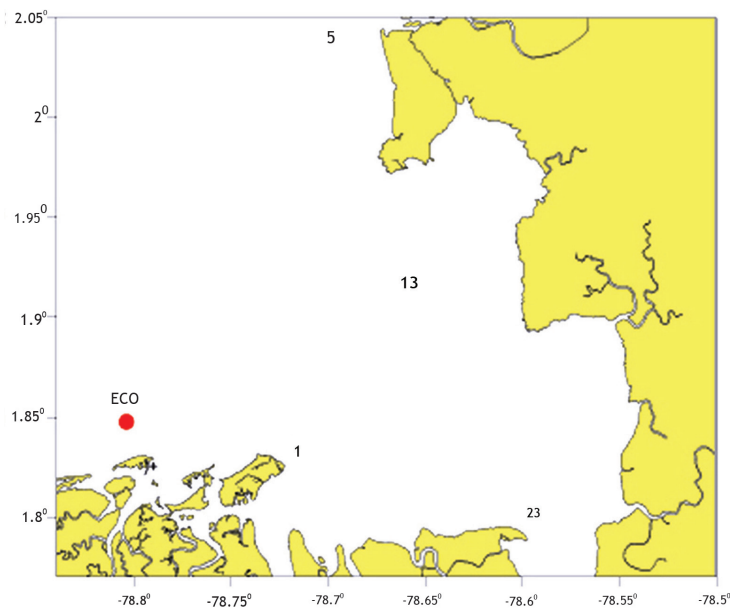
Este microorganismo es el agente causante de la enfermedad diarreica conocida como cólera; se sabe que es una enfermedad de transmisión hídrica [3]. Es responsable de siete pandemias en la historia de la humanidad, aunque las cepas de las pandemias pertenecen a dos serogrupos

(O1 y O139) de *V. cholerae* que contienen el gen de la toxina del cólera [4].

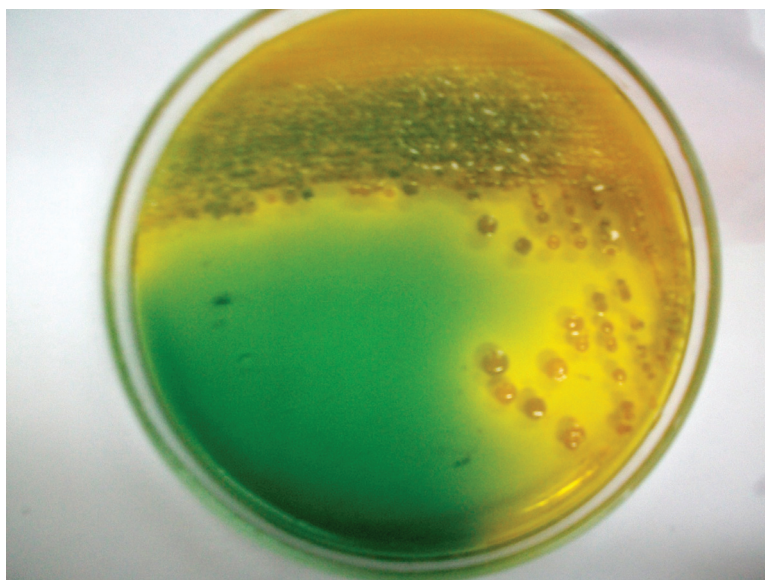
*V. cholerae* está asociado con ambientes acuáticos, conchas, humanos y también se ha asociado con el agua de lastre [5].

Con lo anterior se puede decir que uno de los principales impactos ambientales de las embarcaciones que llegan a los puertos de todo el mundo es la introducción de especies exóticas a través del agua de lastre utilizada para su estabilidad en ruta; dentro de estas especies exóticas se incluyen microorganismos patógenos que pueden afectar la salud de la población, como es el caso de *V. cholerae*; sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado de microorganismos presentes en el agua de lastre, es así como la abundancia y diversidad microbiana asociada con el agua de lastre está comenzando a ser medida [6].

De acuerdo con las resolución A.868 de 1997 de la OMI, se deben tomar acciones unilaterales para prevenir, minimizar y por último eliminar la introducción de organismos acuáticos perjudiciales y patógenos a través de buques de tráfico internacional; además demanda acciones con base en regulaciones aplicadas globalmente junto con normas para su efectiva implementación e interpretación uniforme.



**Figura 1.** Ubicación geográfica del Terminal Multiboyas de Ecopetrol, bahía de Tumaco, Pacífico colombiano.



**Figura 2.** Colonias de *V. cholerae* cultivadas en agar TCBS durante 18 a 24 horas.

Por esto en Colombia la Dirección General Marina (DIMAR) como entidad encargada de hacer cumplir la normatividad nacional e internacional tendiente a la preservación del medio marino, como la resolución A868 y la convención de Londres del 2004, generadas a través del programa GLOBALLAST por la OMI y el Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico (CCCP), ha creado procedimientos estándares para el monitoreo de los tanques de lastre de los buques internacionales que arriban al puerto de Tumaco con el fin de determinar la presencia de *V. cholerae* en aguas de lastre y evaluar los posibles efectos en este ecosistema marino-costero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El universo de estudio comprendió 18 buques cargueros de crudo, en el terminal Multiboyas de Ecopetrol ubicado a una longitud de 78°48.225 y latitud de 1°51.141 en el Puerto de Tumaco, Nariño, entre el 11 de febrero y el 2 de octubre de 2010 (figura 1).

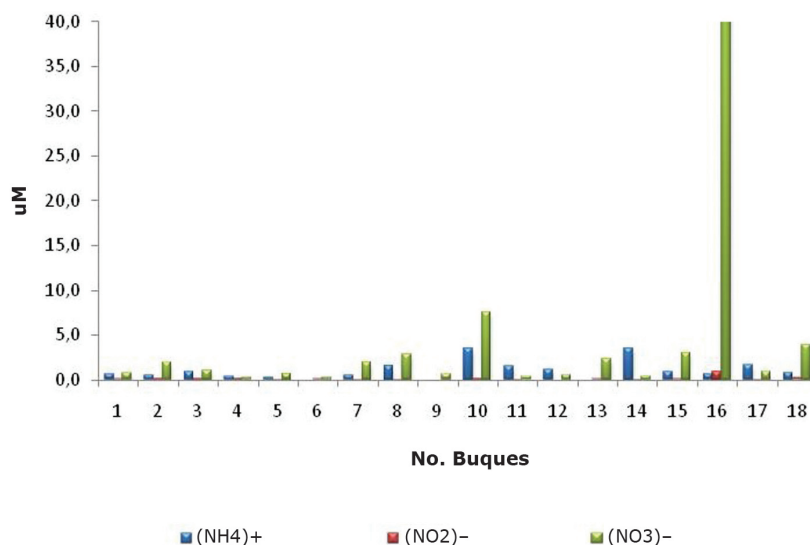
Para la caracterización del agua de lastre de buques de tráfico internacional que arribaron al Terminal Multiboyas se tomaron muestras de tres tanques por buque para análisis fisicoquímico y microbiológico (centrándose en la presencia de *Vibrio cholerae* que es conocido como el agente causante del cólera), eligiendo el método real de muestreo así:

- A. Identificación de métodos seguros y conformes con las operaciones de los buques.
- B. Acceso a los tanques de lastre a través de la apertura de escotillas (manholes), que es el método de muestreo más recomendado [7].
- C. El volumen de descarga y tiempo de residencia del agua en los tanques.

Cada muestra fue obtenida directamente de las escotillas utilizando una botella Niskin de 3 L. Una vez tomado el volumen de agua, se dejó fluir por la válvula de drenaje durante 10-15 segundos y se transvasó asépticamente al frasco Schott de 1000 mL estéril (figura 2), y para los parámetros químicos, el contenido de la botella se pasó a bidones de 3.7 L y frascos plásticos de 500 mL previamente tratados con ácido clorhídrico al 5% [8]. El muestreo, transporte y conservación de las muestras se realizó según parámetros de APHA [9].

En campo se registraron las mediciones de temperatura y salinidad del agua con un multiparámetro YSI modelo 85 y un pHmetro WTW, Multi 340i respectivamente.

Para la determinación de *V. cholerae*, se filtraron 100 mL de la muestra en filtros de 0.45 µm y 47 mm de diámetro; una vez retirados los filtros se depositaron en agua peptonada alcalina (NaCl 1%) e incubados a 35°C ± 2°C de 6 a 8 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó un



**Figura 3.** Comportamiento del Amonio, Nitrito y Nitrato de los buques internacionales.

inóculo de los cultivos y se hizo un aislamiento en agar tiosulfato-citrato-sales biliares- sacarosa (TCBS), y se mantuvo en incubación a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  de 18 a 24 horas.

Trascurrido este tiempo, se seleccionaron de tres a cinco colonias con imagen presuntiva de *V. cholerae* (colonias amarillas debido a la fermentación de sacarosa; se caracterizan por ser redondas, grandes de 2 a 4 mm, lisas, brillantes y ligeramente aplanadas) (figura 2) y se estriaron en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) incubándose a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  de 18 a 24 horas. Posterior a esto, se les hicieron las pruebas bioquímicas y tintoriales: coloración de *Gram*, reacción oxidasa, prueba de la cuerda con el desoxycolato de sodio al 0.5% [10] descarboxilación de L-lisina, L-ornitina, y dihidrolización de L-arginina (LIA), crecimiento en caldo nutritivo con diferentes concentraciones de sales (0, 3, 6, 8 y 10% de NaCl), producción de indol y utilización del citrato como única fuente de carbono [9]. Finalmente, el resultado se reportó como ausencia o presencia en 100 mL.

La presencia de amonio se determinó por el método propuesto por Riley [11] y modificado por Strickland y Parsons [12] y se conoce ampliamente como el método del azul de indofenol; los nitritos a través del método desarrollado por Shinn (1941) y modificado por Bendschneider y Robinson [13]; los nitratos por el método descrito por Strickland y Parsons [12]. Así mismo,

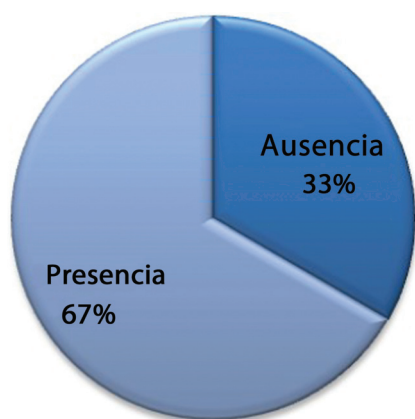
se siguieron las recomendaciones descritas en el Standard Methods 21st Ed 2005.

Por último, se empleó el programa Statistica versión 7.0® para un análisis descriptivo de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la presencia del género *Vibrio spp* cuyas especies son habitantes por excelencia de mares y estuarios ya que tienen la capacidad de crecer en elevadas concentraciones salinas. Sin embargo, algunas de sus especies como *Vibrio cholerae*, pueden tener una patogenicidad alta, comprometiendo la vida del huésped [14]. Por este motivo, es importante determinar la ausencia o presencia de este microorganismo en aguas de lastre para evitar contaminación y propagación en los puertos.

En los resultados fisicoquímicos se encontró que la temperatura registrada del agua varió entre  $26.63 - 32.67^{\circ}\text{C}$ , con un valor promedio de  $28.49 \pm 1.48^{\circ}\text{C}$ ; correspondiendo a la menor temperatura al buque 16 proveniente de Guayaquil (Ecuador) y la máxima al buque 5 proveniente de Long Beach (USA); valores que se encuentran dentro del rango ( $21.3 - 31.0^{\circ}\text{C}$ ) registrado en la bahía de Tumaco; por lo cual, este parámetro no afectaría los procesos biogeoquímicos en el área.



**Figura 4.** Porcentaje de *Vibrio cholerae* en aguas de lastre de los buques internacionales, que arribaron al puerto de Tumaco en el 2010.

La salinidad es otra propiedad física importante del agua de mar ya que puede afectar las funciones fisiológicas de los organismos al alterar su balance osmótico, afectando su distribución y comportamiento [10]. Este parámetro, se registró en un rango de 5.35 ups – 34.70 ups, con un valor promedio de  $27.00 \pm 10.8$  ups. El valor más bajo de salinidad se encontró en el buque 16 proveniente de Guayaquil (Ecuador), y el más alto en el buque 1 proveniente de Los Ángeles (USA).

Los nutrientes son importantes en el agua debido a que tienen un impacto significativo directo o indirecto sobre el crecimiento de los microorganismos. En este sentido, las concentraciones de amonio durante los muestreos estuvieron comprendidos entre el límite de detección ( $0.119 \mu\text{g.at.N}-(\text{NH}_4)^+/\text{L}$ ) hasta  $3.52 \mu\text{g.at.N}-(\text{NH}_4)^+/\text{L}$  con una concentración promedio de  $1.24 \mu\text{g.at.N}-(\text{NH}_4)^+/\text{L}$ .

La concentración de Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) fluctuó entre el límite de detección ( $0.0158 \mu\text{g.at.N}-(\text{NO}_2)^+/\text{L}$ ) y  $0.95 \mu\text{g.at.N}-(\text{NO}_2)^+/\text{L}$ , con un valor promedio de  $0.16 \mu\text{g.at.N}-(\text{NO}_2)^+/\text{L}$ ; El comportamiento de este parámetro fue similar al que se registra en la bahía, observándose concentraciones bajas con respecto a la de los nitratos; en cuanto a este nutriente el rango fue de 0.25 y  $42.53 \mu\text{g.at.N}-(\text{NO}_3)^-/\text{L}$ , con un valor promedio de  $4.00 \mu\text{g.at.N}-(\text{NO}_3)^-/\text{L}$ .

Como se observa en la figura 3, el buque 16 proveniente de Guayaquil, Ecuador, registra altas

concentraciones de nitratos y se consideró tóxico para el crecimiento de *Vibrio cholerae*, registrando ausencia de *V. cholerae* en 100 mL de agua.

Diversos estudios estuarinos y costeros en diferentes partes del mundo han demostrado que la temperatura y la salinidad juegan funciones importantes en la ocurrencia de *V. cholerae*.

Se encontró que el 67% de las embarcaciones no cumplen con la normatividad exigida por la OMI (ausencia/100 mL), debido a que se registró presencia de *V. cholerae* en 100 mL de agua para 12 buques de los 18 monitoreados (figura 4); estos buques provenían de diferentes ciudades del mundo como Long Beach (CA USA), Wilmington (CA USA), Los Ángeles (USA), San Francisco (USA), Martínez (CA USA), Offshore Pacific Lightering Area CA (USA), Guayamas (México) y El Callao (La Pampilla, Perú).

De igual forma se ha encontrado que varios investigadores han reportado la presencia de dicho microorganismo en el agua de lastre de los buques de carga, sugiriendo que la presencia de difusión internacional de *V. cholerae*, es a través de organismos acuáticos cargados en las aguas de lastre, que son descargados en los puertos de la fuente no original del agua, causando graves daño ecológicos y económicos para el ecosistema [3].

McCarthy y Khambaty, dicen que los buques de carga son los vehículos para la transmisión de la epidemia del cólera.

Con los resultados obtenidos en este estudio se puede afirmar que los buques son los que tienen un mayor aporte a las especies invasoras introducidas a los nuevos ambientes a través de las aguas de lastre. Un ejemplo de esto es la epidemia del cólera que fue reportada en 1991 en el Perú y rápidamente se propagó a América Latina y México [10].

Finalmente, el estudio encontró que las condiciones ambientales para el crecimiento de este microorganismo son favorables en aguas de lastre, de ahí la importancia de hacer seguimiento a los buques que deslastran en los puertos para evitar la propagación de la epidemia del cólera.

## CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de *Vibrio cholerae* en un 67% de los 18 buques monitoreados que

arribaron al Terminal Multiboyas de Ecopetrol en Tumaco.

Se observó que las descargas de agua de lastre son un factor importante en la transmisión de este microorganismo.

Los organismos acuáticos perjudiciales y patógenos son introducidos en otros ecosistemas por su traslado en las aguas de lastre, causando contaminación a los puertos donde ingresan.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Leytom Y y Rimelque C. *Vibrios* in the marine coastal systems. Revista de Biología Marina y Oceanográfica. 2008. 43 (3):441-456.
- [2] Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Méndez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. J. Clin. Microbiol. 39: 2134-2139, 2001.
- [3] Huq A., Xu B., Chowdhury M., Islam M., Montilla R, y Colwell R., A Simple Filtration Method To Remove Plankton-Associated *Vibrio cholerae* in Raw Water Supplies in Developing Countries. Applied and Environmental Microbiology, July 1996, p. 2508-2512 Vol. 62, No. 7.
- [4] Sunny Jiang y Ajay K. Goel. Bacteria and viruses in coastal waters: implications to public health from California coast to the Bay of Bengal. Department of Civil and Environmental Engineering, University of California, Irvine, USA; Biotechnology Division, Defense Research y Development Establishment, India \*Corresponding Contact information: 1367, SE II, University of California.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention National Center for Environmental Health Vessel Sanitation Program Health Practices on Cruise Ships: Training for Employees Transcript.
- [6] Joachimsthal, E.L. Ivanov V., Tay, J.-H. & Tay S.T.-L. Bacteriological examination of ballast water in Singapore Harbour by flow cytometry with FISH. En: Marine Poll Bull. 2004. 49 334 – 343p.
- [7] Gollasch, S. German ballast water sampling manual. 1st International Workshop on Guidelines and Standards for Ballast Water Sampling. GloBallast Monography Series. 2003. No. 9, IMO London, 38-45 p.
- [8] CCCP, Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico. Procedimiento para la toma de muestras *in situ* a bordo de una embarcación (Laq-PT-030). San Andrés de Tumaco. 2010-Jun-23 PP.
- [9] American Public Health Association. Standards Methods for the Examination of water and wastewater, 21 ed. Washington, DC: APHA; 2005.
- [10] McCarthy S., Khambaty F. 1994. International Dissemination of Epidemic *Vibrio cholerae* by Cargo Ship Ballast and Other Nonpotable Waters. Applied and environmental microbiology. 1994. Vol. 60. (7). 2597-2601p.
- [11] Murphy, J. y Riley J. P. A modified single solution method for the examination on phosphate in natural water. Anal. Chim. Acta. 1952.
- [12] Strickland, J.D. y Parsons T.R. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa. 1968.
- [13] Bendschneider, K., Robinson, R.J. A new Spectrophotometric Method for the determination of nitrite in sea water. 1952.
- [14] Bravo F. Monte L, Ramirez R, Alvarez M. Aplicación de la técnica de hibridación de colonias para la identificación de *Vibrio cholerae* 01 toxigénico. Rev. Cubana Med Trop. 1996. 48 (3) 169 -170.