



# ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA  
Y CIENCIAS DEL MAR

“CARACTERIZACION DE UNA BACTERIA  
"PROBIOTICA" EN *Penaeus vannamei* Y  
ESTUDIO *in vivo* DE LA INTERACCION CON  
UNA BACTERIA PATOGENA”

TESIS DE GRADO

Previa obtención del Título de:  
ACUICULTOR

Presentada por:  
LORENA DEL ROCIO SAN MIGUEL FIGUEROA

GUAYAQUIL - ECUADOR

1996

# EDICATORIA

A MIS PADRES:  
V́ctor y Judith

A MIS HERMANOS:  
Adela, Nathalie y V́ctor Hugo

A VICTOR

A LA MEMORIA DE MI ABUELITA:  
Delia Judith de Figueroa

**A LUCIA CARRERA FERRER**

## AGRADECIMIENTO

A Dios, por el don de la vida y por permitirme alcanzar mis ideales.

A mis padres, mis guías, quienes han sabido conducirme durante todos estos años y a quienes debo mi desarrollo personal y profesional. Gracias por el amor, por la confianza depositada en mi y el apoyo que me han brindado.

Al CENAIM, lugar en el cual se desarrolló esta tesis, y al Dr. Jorge Calderón, por la oportunidad dada para culminar mis estudios universitarios.

Al Dr. Eric Mialhe, director de tesis, por sus valiosas y sabias enseñanzas, y por la dedicación y generosidad hacia nosotros.

A la Dra. Lucía Carrera, ejemplo de lucha y solidaridad, por enseñarme que cualquier meta planteada por difícil que sea se consigue si uno está verdaderamente dispuesto a luchar. Mi gratitud por sus sabias enseñanzas, su ayuda en la redacción del documento y el apoyo brindado.

A Víctor Vargas, mi gran apoyo, a quien agradezco su cooperación y paciencia en largas jornadas de trabajo, mis más sinceros agradecimientos por tu gran ayuda en el desarrollo de esta tesis, tu dosis de buen humor y comprensión en todo momento....  
GRACIAS por estar siempre presente.

A Mara Zherdmant, mi compañera de tesis y actual compañera de trabajo, por su inmensa ayuda en las experimentaciones, por haberme dado la oportunidad de conocerla, por permitirme contar con ella en todo momento y sobretodo por brindarme su amistad.

A Lourice Ramírez y Antonio Ocaña, a quienes conocí durante mis años de estudio en la universidad y a quienes considero verdaderos amigos.

A Paola Calle, porque cinco años y más de conocernos no pasan en vano y, a Lilia Prieto por ser como es. Gracias a ustedes por su amistad.

A mis compañeros: Ricardo, Xavier A., Marcelo, César, Rubén, y Edward, por los momentos compartidos durante estos meses y por haberme permitido conocerlos verdaderamente.

A Rafaela Ruiz, siempre dispuesta a escucharme en todo momento, gracias por tu valiosa amistad y tu ayuda en una parte de mi tesis.

A Marcelo Muñoz por ser un buen amigo y por su ayuda incondicional.

A Xavier R., Javier S., Xavier A., Chabi, Fernando, José M., Arturo, Ernesto y Mario por los momentos compartidos.

A Emeric Motte, por su ayuda en las técnicas de Biología Molecular y, sus opiniones y sugerencias en el desarrollo de la tesis y en la corrección del manuscrito.

A Gabriel Rivera por las enseñanzas de las técnicas de bacteriología y Philippe Audiot por el conocimiento impartido acerca de los inmunoensayos de colony y dot blot.

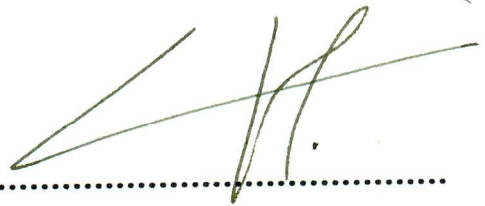
A todos quienes conforman el equipo de bacteriología, inmunología y genética por las opiniones dadas.

A Peter Robertson, por la información y la ayuda brindada en esta tesis.

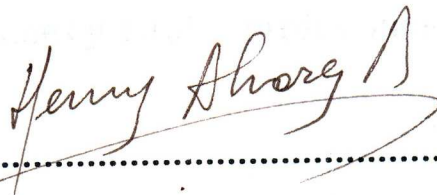
Finalmente, deseo agradecer a Julio Macías, de ACUATEC S.A., a David Garriques y Gorky Arévalo, de GRANJAS MARINAS, a Alberto Cotrina y Víctor Vargas, de VANALARVA y a Jorge Salvatierra de CONTEPISA por haberme facilitado los animales para la realización de las infecciones experimentales.



.....  
Jorge Calderón V., Ph. D.  
Presidente del Tribunal



.....  
Eric Mialhe, Ph.D.  
Director de Tesis



.....  
Henry Alvarez, Ac.  
Primer suplente

## DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

*Lorena San Miguel*

.....  
Lorena San Miguel Figueroa



## RESUMEN

Desde hace algunos años, el uso de bacterias probióticas se ha desarrollado en la larvicultura del camarón *Penaeus vannamei*, pero con una carencia de información sobre las cepas y sin una demostración fiable de su efecto.

A fin de explorar este concepto de probiosis, dos cepas previamente utilizadas como probióticos, ILI y 158, fueron estudiadas. Bioquímicamente, los dos aislados fueron reconocidos como *Vibrio alginolyticus*. Genéticamente se diferenciaron por la presencia de un plásmido de 7.4 Kb en la cepa 158. El análisis antigénico mediante un anticuerpo monoclonal específico de ILI (2B6) permitió diferenciar estas cepas por la presencia de un antígeno particular para ILI.

Mediante infecciones experimentales de larvas de camarón en estadio zoea I (tiempo post-abertura de la boca) fueron progresivamente optimizadas las interacciones larvas de camarón- bacteria probiótica (ILI, *Vibrio alginolyticus*)- bacteria patógena (E22, *Vibrio harveyi*). Se utilizó la técnica de colony blot para el reconocimiento de bacterias introducidas, mediante anticuerpos monoclonales específicos de la cepa E22 (9H4 o 2C9) y de la cepa ILI (2B6).

Mediante una hora de exposición, en concentraciones de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  UFC/ml, la cepa E22 no fue capaz de colonizar el tubo digestivo que reveló contener sólo bacterias previamente

asociadas con las larvas. Consecuentemente, no fue observado el síndrome de "bolitas".

En larvas expuestas a concentraciones de  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC E22/ml durante 4 horas de contacto se observó la presencia de esta bacteria y enfermedad. Finalmente, al introducir  $10^7$  UFC E22/ml sin cambio posterior de agua, se observó colonización en las larvas así como síntomas de "bolitas".

En lo que respecta a la cepa III, con la introducción de  $10^7$  UFC/ml sin recambio de agua se observa colonización en la larva pero, 48 horas después de la infección se dan altas mortalidades atribuidas a la excesiva proliferación de esta bacteria lo cual dañaría la calidad del agua. Subsecuentemente, la cepa III fue introducida sólo durante 4 horas a concentraciones de  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/ml.

A fin de explorar el efecto de probiosis de la cepa III, se realizaron pruebas en las cuales la bacteria probiótica fue puesta en contacto con las larvas 24 horas antes que la bacteria patógena E22. Diferentes tiempos de contacto y diferentes concentraciones bacterianas fueron experimentadas.

La puesta en contacto de zoea I con la cepa III a concentraciones de  $10^8$  y  $10^7$  UFC/ml durante 24 o 4 horas de contacto, y posteriormente con la cepa E22 en  $10^6$  y  $10^7$  UFC/ml durante 4 horas de exposición, condujo únicamente a la observación de colonias de tipo amarillo en las larvas. Sin embargo, con E22 a

una concentración 100 veces mayor a ILI, sólo colonias E22 en la flora de la larva fueron observadas, lo que indica una limitación en la capacidad probiótica de ILI.

La presencia de las dos bacterias en proporciones más o menos equivalentes en la flora bacteriana de las larvas se dió cuando E22 fue puesta en contacto en concentraciones 10 veces mayor o igual a ILI.

Sobre la base de estos resultados se puede considerar que ILI tiene una capacidad probiótica frente a E22 con el proceso de colonización del tubo digestivo, que es de tipo no exclusivo y dinámico en función de las condiciones experimentales.

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCION.....	xi
CAPITULO I	
ANTECEDENTES.....	21
1.1 LARVICULTURA DEL CAMARON EN EL ECUADOR.....	21
1.2 ENFERMEDADES BACTERIANAS QUE SE HAN PRESENTADO EN LA LARVICULTURA DE <i>Penaeus</i> <i>vannamei</i> .....	23
1.3 CARACTERISTICAS DE LOS VIBRIOS.....	27
1.3.1 Caracterización bioquímica.....	29
1.3.2 Caracterización genética.....	30
1.3.2.1 Plásmidos.....	30
1.3.2.2 Perfil de restricción de ADN plasmídico o genómico.....	33
1.3.2.3 Sondas nucleicas.....	34
1.3.2.4 Polimorfismo por patrón de amplificación (RAPD).....	35
1.3.3 Caracterización antigénica.....	37

Anticuerpos policlonales.....	39
Anticuerpos monoclonales.....	39
Inmunoensayos.....	40
Colony-blot.....	41
Dot-blot.....	42
1.4 BACTERIAS PROBIOTICAS.....	43
<b>CAPITULO II</b>	
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>45</b>
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	45
2.1.1 Animales.....	45
2.1.2 Cepas bacterianas.....	45
2.1.3 Anticuerpos.....	46
2.2 METODOLOGIA.....	46
2.2.1 Mantenimiento y siembra de animales.....	46
2.2.2 Técnicas de bacteriología.....	49
2.2.2.1 Preparación de bacterias para infecciones experimentales.....	49
2.2.2.2 Siembra de bacterias para realizar colony blot.....	50
2.2.3 Técnicas de pruebas bioquímicas.....	51
2.2.3.1 Siembra de bacterias para pruebas bioquímicas.....	55
2.2.4 Técnicas Inmunológicas.....	58
2.2.4.1 Colony-blot.....	58

2.2.4.2 Dot-blot.....	61
2.2.5 Técnicas de Biología Molecular.....	61
2.2.5.1 Extracción de ADN plasmídico .....	62
- Método de lisis alcalina: Miniprep.....	62
- Cuantificación de ADN.....	64
- Digestión con enzimas de restricción.....	64
- Electroforesis en gel de agarosa.....	65
2.2.5.2 Purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de electroforesis (kit geneclean).....	67
2.2.5.3 Southern-blot.....	69
Digestión del gel.....	69
Neutralización.....	69
Preparación del sistema de transferencia.....	70
Fijación del ADN sobre la membrana.....	71
Prehibridación.....	71
Hibridación.....	72
Revelado.....	73
CAPITULO III	
RESULTADOS Y DISCUSION.....	74
3.1 CARACTERIZACIONES.....	74
3.1.1 Caracterización bioquímica.....	74
3.1.2 Caracterización genética.....	76
3.1.3 Caracterización e identificación antigénicas.....	80
3.2 ANALISIS DE LAS INTERACCIONES <i>in vivo</i> ENTRE	

BACTERIAS "PROBIOTICAS" Y PATOGENAS.....	83
3.2.1 Experimentación 1.....	85
3.2.2 Experimentación 2.....	88
3.2.3 Experimentación 3.....	92
3.2.4 Experimentación 4.....	96
3.2.5 Experimentación 5.....	99
3.2.6 Experimentación 6.....	101
CONCLUSIONES.....	104
RECOMENDACIONES.....	109
ANEXOS.....	111
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	120

## INDICE DE TABLAS

TABLA No I.	Cepas bacterianas utilizadas en las infecciones experimentales.....	45
TABLA No II.	Principios de los caracteres bioquímicos analizados.....	52
TABLA No III.	Caracteres morfológicos y bioquímicos de dos cepas de <i>Vibrio alginolyticus</i> comparadas con los caracteres de <i>Vibrio alginolyticus</i> según el Manual de Bergey.....	75
TABLA No IV.	Listado de dieciséis hibridomas, tres reconocen a las cepas III y 158 y trece reconocen sólo a la cepa III.....	81
TABLA No V.	Patogenicidad o inocuidad de las cepas E22, 134 ( <i>Vibrio harveyi</i> ), 158, III ( <i>Vibrio alginolyticus</i> ) en larvas de <i>Penaeus vannamei</i> .....	87
TABLA No VI.	Evaluación de diferentes concentraciones de la cepa E22 ( $1 \times 10^4$ , $1 \times 10^5$ , $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^7$ UFC/ml) y tiempo de exposición de 1 hora en larvas zoea I.....	89



TABLA No VII.	Evaluación de diferentes concentraciones de ILI y E22 en un tiempo de exposición de 4 horas en larvas de camarón, estadio zoea I.....	91
TABLA No VIII.	Exploración del efecto probiótico de la cepa ILI frente a la cepa E22. Exposición de larvas a $1 \times 10^7$ UFC/ml durante 4 horas, con reinfección después de 24 horas.....	95
TABLA No IX.	Interacción de ILI con E22. Concentraciones utilizadas: E22: $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^7$ , ILI $1 \times 10^7$ y $1 \times 10^8$ UFC/ml, con tiempos de exposición de 24 y 4 horas para ILI y E22 respectivamente .....	98
TABLA No X.	Interacción de ILI con E22. Concentraciones utilizadas: E22: $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^7$ , ILI: $1 \times 10^7$ y $1 \times 10^8$ UFC/ ml, con un tiempo de exposición de 4 horas para ILI y E22.....	100
TABLA No XI.	Interacción de ILI con E22. Concentraciones utilizadas: E22: $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^7$ , ILI $1 \times 10^5$ y $1 \times 10^6$ UFC/ ml, con un tiempo de exposición de 4 horas para ambas bacterias.....	103

## INDICE DE FIGURAS

FIG. No1. Bacilos cortos Gram negativos.....	28
FIG. No 2. Corte de ADN por una enzima de restricción....	33
FIG. No 3. Sondanucleica.....	34
FIG. No 4. Comparación de propiedades de anticuerpos policlonales y monoclonales.....	38
FIG. No 5. Colony-blot.....	42
FIG. No 6. Sistema utilizado para las infecciones experimentales.....	48
FIG. No 7. Pruebas bioquímicas.....	55
FIG. No 8. Colony blot. Incubación de membranas con solución bloqueadora.....	60
FIG. No 9. Electroforesis. Migración de ADN (carga negativa) hacia el ánodo o polo positivo .....	67
FIG. No 10. Southern blot. Transferencia de ADN hacia una membrana de nylon.....	71
FIG No 11. ADN de las cepas III y 158.....	77
FIG. No 12. Patrón de restricción de la cepa 158.....	79

## INTRODUCCION

La construcción de laboratorios para la producción de postlarvas de camarón en el Ecuador, se inició en 1979. El factor esencial que influyó en su creación fue la necesidad de liberarse de la dependencia de un suministro (de larvas) estacional variable.

A mediados de 1984 con la implementación de tecnología para la producción de larvas se inicia el "boom" de la construcción de laboratorios para abastecer la demanda de larvas del mercado. Pero algunos factores han limitado el desarrollo de la larvicultura, especialmente las enfermedades causadas por agentes infecciosos como las bacterias.

Tradicionalmente, para controlar estas enfermedades causadas por bacterias se han utilizado antibióticos en pequeñas dosis y sobre largos periodos de tiempo, lo que ha permitido un incremento de cepas bacterianas resistentes haciendo dificultoso un tratamiento efectivo.

Actualmente, algunos laboratorios intentan con la utilización de probióticos controlar a las bacterias patógenas. Sin embargo este enfoque es empírico, porque por una parte no existe conocimiento suficiente sobre las características de las bacterias asociadas con las larvas de camarón y, por otra parte, no se ha demostrado el efecto de probiosis de estas cepas contra aislados patógenos.

Esta carencia de información explica la necesidad preliminar de contar con sondas moleculares específicas de cepas posiblemente patógenas y probióticas, que permitan analizar con precisión las interacciones entre bacterias *in vitro* o en la larva.

En el presente trabajo se efectuó la caracterización bioquímica, genética y antigénica de dos cepas de *Vibrio alginolyticus*, utilizadas como "probióticos" por un laboratorio de larvas de camarón. Posteriormente se realizaron una serie de infecciones experimentales en larvas con estas cepas bacterianas, consideradas "probióticos" (*Vibrio alginolyticus*) y otra patógena (*Vibrio harveyi*), siendo el objetivo establecer un modelo de estudios *in vivo* en sus interacciones.

# CAPITULO I.

## ANTECEDENTES

### 1.1 LARVICULTURA DEL CAMARON EN EL ECUADOR

El cultivo de camarón en el Ecuador se inicia a finales de los años sesenta y principio de los setenta, en la provincia de El Oro. Mediante ensayos iniciales se determinó que la especie más adecuada para el cultivo era el camarón blanco *Penaeus vannamei*, y que el *P. stylirostris* podría también ser cultivado aunque con resultados inferiores (Horna, 1987).

A fines de 1973 las camaroneras cubrían una superficie de 600 Ha, todas ellas en la provincia de El Oro. Hacia 1978 - 1979 se inició la construcción de camaroneras en las provincias de Guayas y Manabí. Posteriormente se construyeron estanques en la provincia de Esmeraldas. Es a partir de 1981 cuando se inicia la fiebre de la construcción de camaroneras en el Ecuador, que trajo como consecuencia el espectacular aumento de las exportaciones de camarón blanco a los Estados Unidos (Horna, 1987).

Para satisfacer la demanda de larvas de camarón, en 1979 se inició la construcción de laboratorios cuando aún no se presentaba un problema serio de aprovisionamiento de semilla. La liberación de la dependencia de un suministro

estacional variable, la posibilidad de contar con semilla de talla homogénea de la especie deseada y la existencia de tecnología, fueron incentivos suficientes para convencer a algunos empresarios de invertir en la construcción de laboratorios.

A mediados de 1984 se empezó a sentir seriamente la falta de postlarvas para la superficie de estanques construídos. Ecuador contaba solamente con cuatro laboratorios operacionales que producían menos de 0.3 billones de postlarvas. Muchos de los primeros laboratorios fueron diseñados para la obtención de nauplios de maduración, lo que les causó considerables problemas porque la maduración del camarón resultaba una disciplina poco conocida en la que pocos especialistas, aún de países técnicamente más avanzados, habían experimentado con *P. vannamei*. Las empresas ecuatorianas encontraron serias dificultades para atraer el personal altamente entrenado que se necesitaba para realizar las etapas de maduración, por lo que los resultados iniciales fueron descorazonadores. Sin embargo la actividad de los laboratorios logró expandirse rápidamente a partir de 1984 alentada por la escasez y alta demanda de postlarvas. En 1986, operaban casi 40 laboratorios que producían en conjunto alrededor de 2.0 billones de postlarvas anualmente (Depto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991).

En 1988 la larva de laboratorio abastecía el 16 % de la demanda; a partir de 1989, como resultado de un ciclo de escasez de larva silvestre, los productores camaroneros estuvieron dispuestos a pagar por la larva de laboratorio un precio de sustentación. Como resultado, creció el número de laboratorios y su producción (Libro blanco del camarón, 1993) llegando a poseer esta industria en 1990, 150 laboratorios que produjeron casi 8.0 billones de postlarvas, para abastecer casi el 70 % de la provisión de larvas requerida por todas las piscinas ecuatorianas (Depto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991).

En la actualidad, ha disminuído notablemente la dependencia de las piscinas camaroneras de la larva silvestre. Para 1992, ante una demanda anual estimada en 14 billones de larvas, los laboratorios cubrieron el 60 % de esta demanda, con una producción anual de 8.4 billones de larvas (Libro blanco del camarón, 1993).

## 1.2 ENFERMEDADES BACTERIANAS QUE SE HAN PRESENTADO EN LA LARVICULTURA DE *P. vannamei*.

El rápido crecimiento de la industria de cultivo de camarones peneidos en América y Asia se ha visto frenada a causa de las enfermedades (Sindermann y Lightner, 1988). Varias enfermedades han afectado a la producción de los laboratorios ecuatorianos, especialmente a los de mayor tamaño. Los gérmenes pueden ser de naturaleza viral,

bacteriana, parasitaria o micótica (Depto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991).

Las bacterias están implicadas en enfermedades y mortalidades de peneidos cultivados, especialmente en los estadios de larva, postlarva y juvenil. Las infecciones bacterianas en camarones, pueden tomar tres formas generales: erosión de la cutícula cubriendo la superficie del cuerpo, branquias y apéndices (necrosis bacteriana y enfermedades cuticulares); lesiones localizadas dentro del cuerpo, y septicemias generalizadas (Lightner, 1992)

Sin duda, la enfermedad más común, conocida como "bolitas", ha provocado desde su aparición en 1987 elevados porcentajes de mortalidad en los laboratorios afectados. Los síntomas observados consisten en una descamación de las células de las paredes del hepatopáncreas e intestino de las larvas, que mueren en pocas horas, pudiendo perderse casi el 100 % de la población (Morales, 1992). Esta enfermedad, causada por una bacteria identificada mediante pruebas bioquímicas como *Vibrio harveyi*, se ve agravada por factores como los altos recuentos bacterianos en los tanques, las bajas temperaturas o nauplios débiles (Depto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991).

Algunas de las enfermedades de los peneidos son consecuencia del sistema de cultivo empleado (intensivo, semi-intensivo y extensivo) (Sindermann y Lightner, 1988).



Por ejemplo, una de las posibles causas de la proliferación bacteriana en piscinas es la alta densidad de camarones (sistema intensivo), lo que permite la adaptación y selección de cepas virulentas de bacterias oportunistas asociadas al camarón y/o cepas patógenas que se encuentran normalmente en el medio acuático. Además, estas condiciones de cultivo pueden estresar a los animales y afectar su fisiología y su capacidad inmunitaria, trayendo como consecuencia la sensibilidad de los animales a bacterias oportunistas y normalmente poco patógenas (Le Bitoux, 1988).

Algunos casos de septicemia se han presentado en piscinas que han tenido varios ciclos completos de producción seguidos, sin espacios de tiempo de secado, lo que provee el tiempo necesario para la selección de cepas bacterianas virulentas (Jiménez, 1992).

Dentro del ecosistema "artificial" que constituye el criadero, se instala una microflora diferente a la del medio marino natural. Las poblaciones bacterianas de tipo "primario" según Martín (1977), dan paso a una microflora de "regeneración", característica de los medios ricos en materia orgánica.

La utilización de antibióticos también altera la microflora de las piscinas, pues puede provocar una reducción de la diversidad bacteriana que puede ser en detrimento de

ciertas bacterias favorables y contribuir así al desarrollo de bacterias patógenas (Le Bitoux,1988).

Finalmente, se puede observar un aumento de la patogenicidad en cepas bacterianas por cambios genéticos (conjugación, transformación, transducción) y selección (mejor adaptación a las condiciones de cultivo y al camarón). Por ejemplo, la transferencia de material genético entre bacterias, como plásmidos en los que se localizan genes responsables de alteraciones en la regulación osmótica a nivel del tubo digestivo.

En la acuicultura, se puede temer no solamente la aparición de numerosas cepas patógenas sino también su dispersión debido a la ausencia de medidas profilácticas y de diagnóstico. Otro riesgo está relacionado a las perturbaciones del medio ambiente y las contaminaciones porque los animales cultivados no se pueden adaptar tan rápidamente como los microorganismos (Le Bitoux, 1988).

La habilidad para limitar la aparición de bacterias patógenas en los cultivos larvarios intensivos de camarones peneidos es un aspecto primordial para la producción y calidad de la larva. En los laboratorios comerciales del Ecuador, la mayoría de las prácticas de manejo tienen como objetivo controlar el desarrollo de bacterias patógenas mediante la desinfección del agua (tratamiento con UV, clorinación, filtración, etc.), utilización de stocks de algas estériles, limpieza de artemias,

y prácticas de higiene tales como desinfección del equipo, baños para pies, etc. (Garriques y Arévalo, 1995). Además, para prevenir o combatir las enfermedades provocadas por bacterias, se ha hecho uso de los antibióticos, los cuales utilizados en pequeñas dosis y sobre largos periodos de tiempo, han permitido un incremento del número de poblaciones bacterianas resistentes haciendo dificultoso un tratamiento efectivo, fenómeno que ha sido ampliamente descrito en medicina humana y animal (Smoragiewicz *et al.*, 1993).

Al parecer la mayoría de las bacterias que afectan al camarón son patógenos oportunistas que forman parte de su microflora normal (Lightner, 1983). Los vibrios han sido identificados como el género dominante de la flora bacteriana normal de muchos crustáceos marinos (Vanderzant *et al.*, 1971; Sizemore *et al.*, 1975; Yasuda and Kitao, 1980; Dempsey and Kitting, 1987; Sugita *et al.*, 1987; Dempsey *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1990; en Garriques y Arévalo, 1995) y también como las principales bacterias involucradas en las enfermedades del camarón.

### 1.3 CARACTERISTICAS DE LOS VIBRIOS

Las bacterias que más frecuentemente se asocian con las enfermedades del camarón son las del género *Vibrio* (Mohny, Lightner, Bell. 1994). Se encuentran clasificadas

dentro del grupo V según el Manual de bacteriología determinativa de Bergey.

Pertenecen a la familia Vibrionaceae. Son microorganismos procariotas de tipo Gram negativo (Fig. No. 1), de estructura simple en su pared y anaerobios facultativos (Drlica, 1992; Lechevalier, 1977).

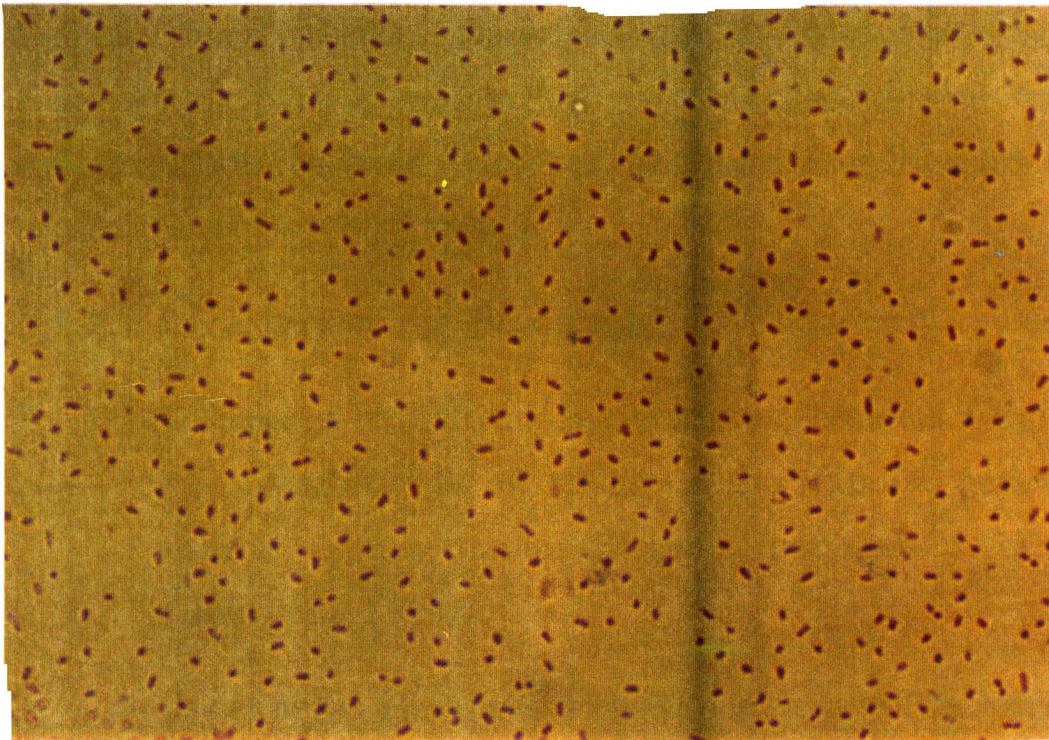


Fig. No. 1 Bacilos cortos Gram negativos.

Normalmente son bacilos curvos o rectos, de  $0.5 - 0.8 \mu$  de ancho y  $1.4 - 2.6 \mu$  de largo. Presentan motilidad gracias a uno o más flagelos que están encerrados en una envoltura continua con la membrana externa de la pared celular (Singleton, Sainsbury, 1993).

Algunos vibrios son patógenos para humanos y otros para vertebrados e invertebrados marinos. Los patógenos humanos más notables son *V. cholerae*, el agente causal del cólera; *V. parahaemolyticus*, causante de envenenamiento por ingestión de peces y moluscos contaminados; y *V. vulnificus* que provoca una septicemia en muchas ocasiones fatal. Estas y otras especies están asociadas con infecciones intestinales, diarreas y una variedad de infecciones extraintestinales (Holt, *et al.*, 1994). Debido a que ciertos vibrios son patógenos para humanos, tal como *V. cholerae*, se han desarrollado reactivos y pruebas confiables y seguras para su caracterización y diagnóstico.

### 1.3.1 Caracterización bioquímica

Se basa en un patrón de caracteres comunes a todos los miembros de un mismo grupo (familia, género, especie, cepa) y que los diferencia por tanto de otros (Holt, *et al.*, 1994).

Las pruebas bioquímicas consisten en la utilización de medios de cultivo específicos, para la identificación de una característica metabólica. La técnica empleada se refiere a la bacteriología clásica involucrando la siembra de bacterias, previamente purificadas, en los diferentes medios y la consiguiente lectura de la positividad o negatividad de cada reacción específica de un criterio bioquímico (Néder, 1989).

La utilización de estas pruebas bioquímicas es el fundamento de la caracterización y de la distinción de cepas o especies bacterianas mediante lecturas diferenciables entre los aislados bacterianos (Néder, 1989).

### 1.3.2. Caracterización genética

Hasta hace poco, la taxonomía de las bacterias estuvo basada en criterios tales como reacción de Gram, morfología, requerimiento de sustrato, presencia y posición de flagelos, etc; tales criterios servían para la elaboración de esquemas taxonómicos. Actualmente se da mayor énfasis a criterios moleculares que permiten el conocimiento más exacto de un microorganismo (Singleton, Sainsbury, 1993).

Entre los criterios para la caracterización genética de una bacteria se encuentran la presencia de plásmidos, tamaño del plásmido y el mapa de restricción (número y tamaño de fragmentos obtenidos tras la digestión del plásmido con una enzima de restricción) (Drlica, 1992). Nuevas metodologías están siendo evaluadas actualmente, tal como la técnica de RAPD.

#### 1.3.2.1. Plásmidos

Los plásmidos son pequeñas moléculas de ADN circular, independientes del ADN

cromosómico y presentes en numerosas bacterias (también en algunas levaduras y hongos). Tienen sus propios orígenes de replicación, replicándose por tanto de forma autónoma, y son heredados de manera estable (Prescott, 1993). Los plásmidos más pequeños tienen cerca de 5000 pares de nucleótidos en comparación con el genoma de *E. coli* que contiene ligeramente más de 4 millones de pares de nucleótidos (Drlica,1992).

La información genética de los plásmidos no es esencial para el huésped y, bacterias que no lo presentan funcionan normalmente. Su importancia radica en que estas moléculas de ADN extracromosómico les confieren ciertas ventajas como resistencia a los antibióticos, producción de proteínas letales para otras bacterias (bactericinas) o producción de enzimas que les permite degradar sustancias tales como pesticidas, compuestos aromáticos y azúcares (Prescott, 1993).

Algunas bacterias poseen la capacidad genética para sintetizar compuestos conocidos como bactericinas que son proteínas

bacterianas que destruyen otras bacterias. Las bactericinas actúan abriendo poros en la membrana plasmática aumentando así su permeabilidad, degradando ADN o ARN, o debilitando la pared celular (afectan al peptidoglucano) (García y Quintana, 1992; Prescott, 1993). Estas sustancias tóxicas pueden ser simples polipéptidos o macromoléculas muy complejas. La característica de ser una cepa “asesina” es codificada frecuentemente por genes plasmídicos, aunque también puede ser codificada por genes cromosómicos (García y Quintana, 1992).

La bacteria *Escherichia coli* contiene bactericinas conocidas como colicinas, codificadas por dos genes. El gen *cma* codifica para la colicina M la cual va a permitir la fijación de la bacteria en el receptor de la superficie celular de otra, introducir la toxina a la bacteria y destruirla al bloquear la biosíntesis del peptidoglucano y del antígeno O. El gen *cmi* codifica para otra proteína que le confiere inmunidad a la *E. coli* mientras la colicina M actúa sobre otra bacteria (Harkness, 1991).



### 1.3.2.2. Perfil de restricción de ADN plasmídico o genómico

El ADN es cortado por enzimas conocidas como endonucleasas de restricción las cuales reconocen y cortan secuencias específicas de ADN (Fig No. 2). El corte de ADN con estas enzimas produce fragmentos de ADN. Por las diferencias en la composición de ADN se producen distintos tipos de corte por enzimas con la producción subsecuente de fragmentos de diferentes tamaños. Este tipo de análisis produce un perfil de fragmentos de un ADN plasmídico en un gel de electroforesis que es característico de cada plásmido tratado con una enzima de restricción particular (Drlica, 1992).

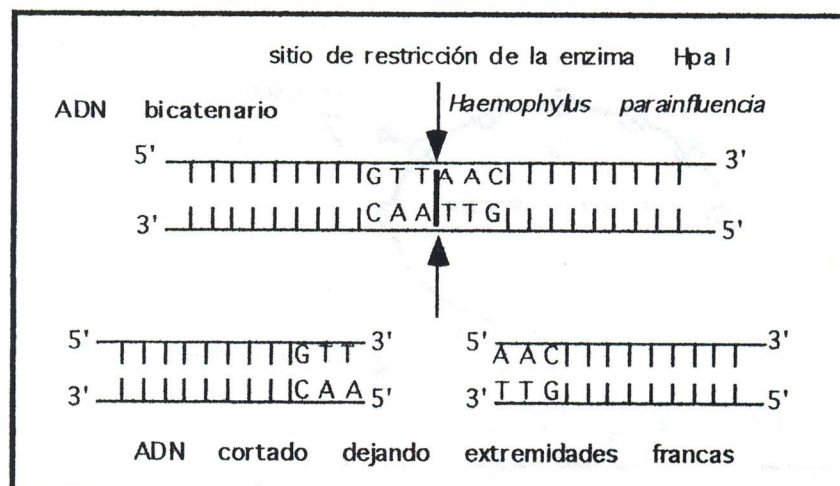


Fig. No. 2. Corte de ADN por una enzima de restricción.

### 1.3.2.3. Sondas nucleicas

Las sondas nucleicas representan una tecnología relativamente reciente para la caracterización y la identificación de cepas bacterianas que consiste en la detección de una porción específica de material genético del microorganismo.

Una sonda es un fragmento monocatenario marcado de un ácido nucleico (ADN o ARN), que tiene la propiedad de hibridarse por complementariedad de las bases nucleotídicas con el ADN o ARN complementario. Este fragmento es específico de la secuencia que complementa, de ahí su gran interés en el diagnóstico para detectar directamente la presencia de esa secuencia (Fig. No. 3).

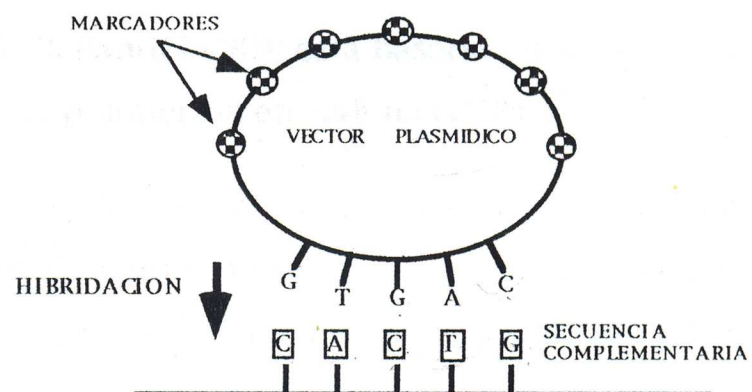


Fig. No. 3. Sonda nucleica

Para la taxonomía y la caracterización de cepas bacterianas se podrían preparar sondas nucleicas de aislados bacterianos de interés y utilizarlas para la identificación de aislados con las mismas características genéticas. También se pueden utilizar sondas nucleicas en la identificación de cepas patógenas, por ejemplo cuando se conoce un gen de una toxina y se pueden preparar sondas nucleicas para identificar la presencia de este gen en aislados problema.

#### 1.3.2.4. POLIMORFISMO POR PATRON DE AMPLIFICACION. RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA (RAPD)

La técnica de RAPD, desarrollada por Williams *et al.*, (1990) y Welsh y McClelland(1990); está basada en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

La PCR es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en Biología Molecular y fue desarrollada por Kary Mullis en 1985. Permite producir un gran número de fragmentos idénticos (copias) a partir de un solo fragmento de ADN del que se conocen las

secuencias que lo flanquean. Es un proceso cíclico que está dividido en 3 fases: la primera, en donde la cadena doble del ADN es separada por elevación de temperatura en 2 cadenas individuales y se conoce como desnaturalización; la segunda fase, hibridación, donde los iniciadores o secuencias conocidas que flanquean el fragmento a ampliar hibridan con sus secuencias complementarias y "disparan" la siguiente fase o polimerización en la cual una ADN polimerasa, resistente a temperaturas elevadas, cataliza la producción de nuevas cadenas complementarias a las dos anteriores. La región amplificada está limitada lateralmente por cada iniciador al hibridarse con su correspondiente cadena. Este proceso se repite  $n$  veces y cada ciclo implica una duplicación del número de fragmentos presentes, consiguiendo al final  $2^n$  copias (Erlich, 1992).

La técnica de RAPD involucra el uso de iniciadores (oligonucleótidos arbitrarios) de 10 nucleótidos que amplifican (copian) segmentos aleatorios del genoma. Una electroforesis en agarosa de la muestra, nos

revelará distintos patrones de fragmentos de amplificación, en base a la diferente composición de los ADN de origen. Cuenta con la ventaja adicional de poder utilizar un número casi ilimitado de iniciadores para detectar más variación genética y marcadores específicos de familias o poblaciones (Baird *et al.*, 1992; Woodward *et al.*, 1992; Neto *et al.*, 1993; Procunier *et al.*, 1993 en García *et al.*, 1994).

### 1.3.3. Caracterización antigénica

Los criterios inmunológicos corresponden a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Un antígeno es una sustancia que, cuando es inyectada en un vertebrado, es reconocida como extraña y provoca una respuesta inmune celular y/o humoral con la producción de anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas inmunoglobulinas producidas por las células B en respuesta al antígeno. Cada célula B produce solamente un tipo de anticuerpo específico de un antígeno (Singleton/ Sainsbury, 1993).

Aunque estos criterios tienen enormes valores para diagnóstico e identificación específica de cepas bacterianas, tienen valores limitados si se utilizan sólo en clasificación porque pueden ser no

suficientemente sensibles para reconocer especies bacterianas relacionadas.

Por tanto, la caracterización antigénica depende de la preparación de anticuerpos, que son de dos tipos, los anticuerpos policlonales y los monoclonales que poseen características y ventajas diferentes en relación con su uso (Fig. No.4).

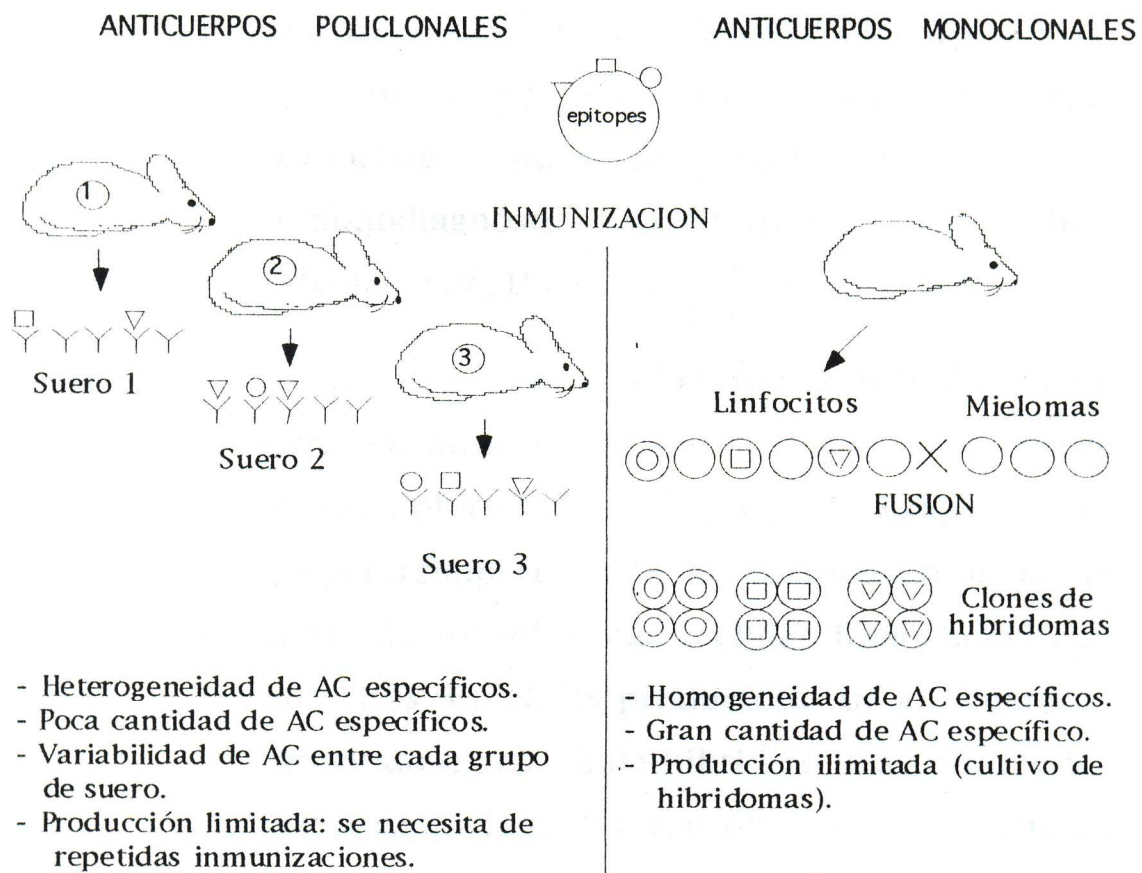


Fig. No. 4. Comparación de propiedades de anticuerpos monoclonales y policlonales. Triángulo, cuadrado y círculo = determinantes inmunoglobulina específica para el determinante antigénico; triángulo, cuadrado y círculo dentro de circunferencia

= linfocitos secretores de inmunoglobulinas específicas para el determinante antigénico.

- Anticuerpos policlonales: ó inmunosuero, se obtienen a partir de un animal inmunizado y es por tanto una mezcla de inmunoglobulinas que tienen diversas especificidades. Esto reduce la especificidad del inmunosuero porque reaccionará contra otras bacterias que tengan ciertos antígenos idénticos (Singleton/ Sainsbury, 1993). Los anticuerpos policlonales pueden presentar dificultades para desarrollar métodos de inmunodiagnóstico cuantitativos y reproducibles (Mialhe *et al.*, 1988).
- Anticuerpos monoclonales: son poblaciones puras de anticuerpos idénticos que reconocen el mismo determinante específico (epítope) en un antígeno simple o complejo. Se obtienen mediante la fusión de mielomas (células inmortales) con linfocitos B (células productoras de anticuerpos) formándose una célula híbrida que se caracteriza por permitir la multiplicación y producción de un tipo de anticuerpo (Singleton/ Sainsbury, 1993). Después del clonaje del hibridoma, las células hijas producen solamente un tipo de anticuerpo, monoclonal, que son reactivos hiperespecíficos de

un epítope y por lo tanto permiten identificar con gran especificidad un tipo de microorganismo.

Debido a su especificidad, disponibilidad ilimitada y homogeneidad, los anticuerpos monoclonales pueden ser estandarizados para su uso en inmunoensayos altamente sensibles y específicos, especialmente para la detección de cantidades pequeñas de agentes infecciosos en especímenes clínicos. También pueden ser valiosos detectando la variación antigénica entre diferentes estadios o especies de parásitos, lo cual podría ser un procedimiento más difícil de efectuarse con anticuerpos policlonales (Mialhe *et al.*, 1988).

### Inmunoensayos

Diferentes inmunoensayos son empleados en salud humana y veterinaria, se basan en las reacciones específicas antígeno - anticuerpo con diferentes marcadores. Los inmunoensayos son adecuados especialmente para detectar antígenos en estudios epidemiológicos de enfermedades bacterianas, particularmente a través de las técnicas de Colony blot y Dot blot (Mialhe *et al.*, 1988).



### Colony-blot

Esta técnica se utiliza para la identificación específica de colonias bacterianas de una misma cepa. Consiste en la siembra de bacterias en cajas Petri sobre un medio de cultivo adecuado. Después de 6 a 8 horas de cultivo, las colonias bacterianas que crecen en el agar a partir de una muestra son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente son incubadas con una solución bloqueadora para reducir la capacidad de fijación no específica en la membrana. Los epítopes del antígeno reaccionarán con los anticuerpos monoclonales y se producirá el complejo antígeno - anticuerpo. Un segundo anticuerpo conjugado con una enzima va a reconocer al primer anticuerpo en este complejo. Al añadir el sustrato adecuado se activará la enzima originando un precipitado coloreado sobre las colonias positivas (Fig. No. 5).

Es un método sensible, específico y rápido que permite conocer el porcentaje de bacterias de la caja que reaccionan con el anticuerpo específico para una determinada especie bacteriana.

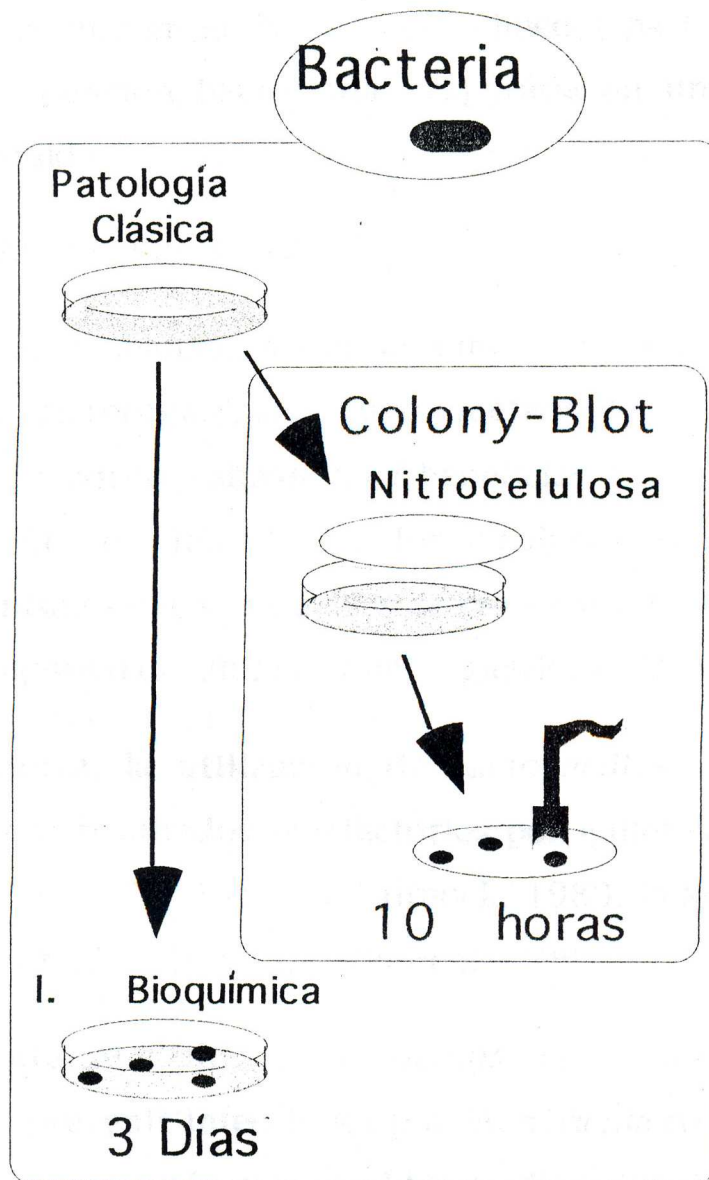


Fig. No. 5: Colony blot

### Dot-blot

La técnica de dot - blot también se utiliza para diagnóstico por medio de la reacción antígeno-anticuerpo. El procedimiento a seguir es similar al colony-blot, con la diferencia que la fijación del

antígeno en la membrana se hace a partir de una suspensión bacteriana preparada en un tampón líquido.

#### 1.4 BACTERIAS PROBIOTICAS

Este término, probiótico, se define como: "preparaciones que contienen microorganismos cuyos metabolitos, cuando se utilizan como aditivos alimenticios benefician al huésped. En la mayoría de los casos, los probióticos incluyen microorganismos que son capaces de crecer y/o funcionar en el tracto digestivo del animal" (Smoragiewicz *et al.*, 1993).

En agricultura, la utilización de *Lactobacillus* sp. fue reportada con resultados satisfactorios por Fuller & Turvey, 1971; Parker, 1974; Roach & Tannock, 1980; Fuller, 1978; Smoragiewicz *et al.*, 1993 (Austin *et al.*, 1995).

Comúnmente se utiliza *Lactobacillus acidophilus* para controlar y prevenir infecciones por *Escherichia coli* y otros microorganismos patógenos en el tracto digestivo de algunos animales terrestres (Morishita *et al.*, 1971; Tortuero, 1973; Muralidhara *et al.*, 1977; Ellinger *et al.*, 1980, en Garriques y Arévalo, 1995).

En Acuicultura, el uso de probióticos en laboratorios comerciales de *P. vannamei* en el Ecuador, ha sido reportado por Morales (1992), y Garriques y Arévalo (1995). Los probióticos surgen como una alternativa al uso de

antibióticos en las estrategias de control de enfermedades en larvas de camarón (Austin *et al*, 1995).

Los mecanismos de acción de las cepas probióticas son poco conocidas, existiendo diferentes características que pueden conferirle su capacidad probiótica:

- Producción de vitaminas o enzimas que ayuden a la larvas en sus procesos metabólicos.
- Competencia por sitios de fijación con la bacteria patógena.
- Competencia por nutrientes con el patógeno.
- Producción de sustancias que inhiban el crecimiento de patógenos oportunistas (Prescott, 1993).

Smoragiewicz *et al.* (1993), concluyen que los probióticos no matan otras bacterias pero compiten con ellas, inhibiendo su desarrollo, finalmente conllevan a la restauración del balance biológico.

Las bacterias utilizadas como probióticos son cepas de la especie *V. alginolyticus* (Austin *et al.*, 1995; Garriques y Arévalo, 1995). Trabajos efectuados por Garriquez y Arévalo (1995), reportaron mayor sobrevivencia y peso húmedo en tanques a los cuales inocularon la bacteria probiótica.

## CAPITULO II.

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

##### 2.1.1 Animales

Las larvas de *Penaeus vannamei*, estadio zoea 1, fueron obtenidas de diferentes laboratorios localizados en la península de Santa Elena.

##### 2.1.2 Cepas bacterianas

Tabla No I. Cepas bacterianas utilizadas en las infecciones experimentales.

CEPA	PROCEDENCIA	UTILIZACION DE CEPAS Y CARACTERISTICAS
E 2 2	Larvas de laboratorio con bolitas.	Utilizada como la cepa patógena en las infecciones experimentales. Colonia verde luminiscente.
1 L 1	Laboratorio de larvas de camarón en el cual se utilizó como probiótico. Aislada del mar.	Cepa utilizada como probiótico en las infecciones experimentales. Colonia amarilla no luminiscente.
1 5 8	Cepa utilizada como probiótico en un laboratorio de larvas. Aislada del mar	Utilizada en la evaluación de patogenicidad. Colonia amarilla no luminiscente.
1 3 4	Aislada de larvas de laboratorio con bolitas.	Utilizada en la evaluación de patogenicidad. Colonia verde luminiscente.

### 2.1.3 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para la caracterización antigénica de las cepas de *V. alginolyticus* y en las infecciones experimentales, fueron obtenidos mediante inmunización de ratones balb-c y posterior hibridación linfocitaria. Los anticuerpos 2C9 y 9H4 proceden de hibridomas obtenidos tras la inmunización con una cepa de *V. harveyi* (S2). El anticuerpo 2B6 procede de un hibridoma obtenido de ratones inmunizados con la cepa III de *V. alginolyticus*.

Los anticuerpos 2C9 y 9H4 provenían de líquido ascítico obtenido tras la inoculación intraperitoneal de ratones balb-c con el hibridoma. Como estos anticuerpos se encuentran muy concentrados en el líquido ascítico, se utilizaron en diluciones de 1/10.000 y 1/1.000 respectivamente. El anticuerpo 2B6 procedía de cultivo celular del hibridoma y se utilizó sin diluir.

## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Mantenimiento y siembra de animales

A su recepción en CENAIM, las larvas fueron transferidas a un tanque con agua de mar a 35 UPS, filtrada (cartuchos de 5, 1 y 0.5  $\mu$ ) y esterilizada

mediante tratamiento de UV (AQUANETICS SYSTEMS, INC). Después se procedió a la siembra de las larvas en botellas de 3.5 litros. Cuando los animales llegaron en estadio nauplio V fueron mantenidos en un tanque con algas hasta que mudaron a zoea I y fueron sembrados en cada botella a una densidad de 100 larvas/ litro.

Los materiales utilizados como botellas, mangueras, pipetas, etc., fueron lavados con jabón neutro y autoclavados (SIBATA SCIENTIFIC TECHNOLOGY LTD. modelo DS-300) a 121 °C, 15 libras de presión, durante 30 minutos. Antes de empezar las experimentaciones los filtros de cartucho fueron desinfectados con cloro.

Las botellas se colocaron en cajones de fibra de vidrio. Se utilizó el sistema de Baño María para el mantenimiento de la temperatura a 28 °C, siendo regulada por medio de calentadores o termostatos (Fig. No. 6).

La aireación fue suministrada a través de una tubería de PVC (con varios puntos de salida de aire), suspendida encima del cajón donde se colocaron las botellas. A la tubería le fueron colocadas mangueras para distribuir el aire hacia las botellas. Para prevenir una posible contaminación de las bacterias hacia las

tuberías y de una botella a otra, se colocaron tapones de algodón a las pipetas Pasteur que llevaban el aire a cada una de ellas.

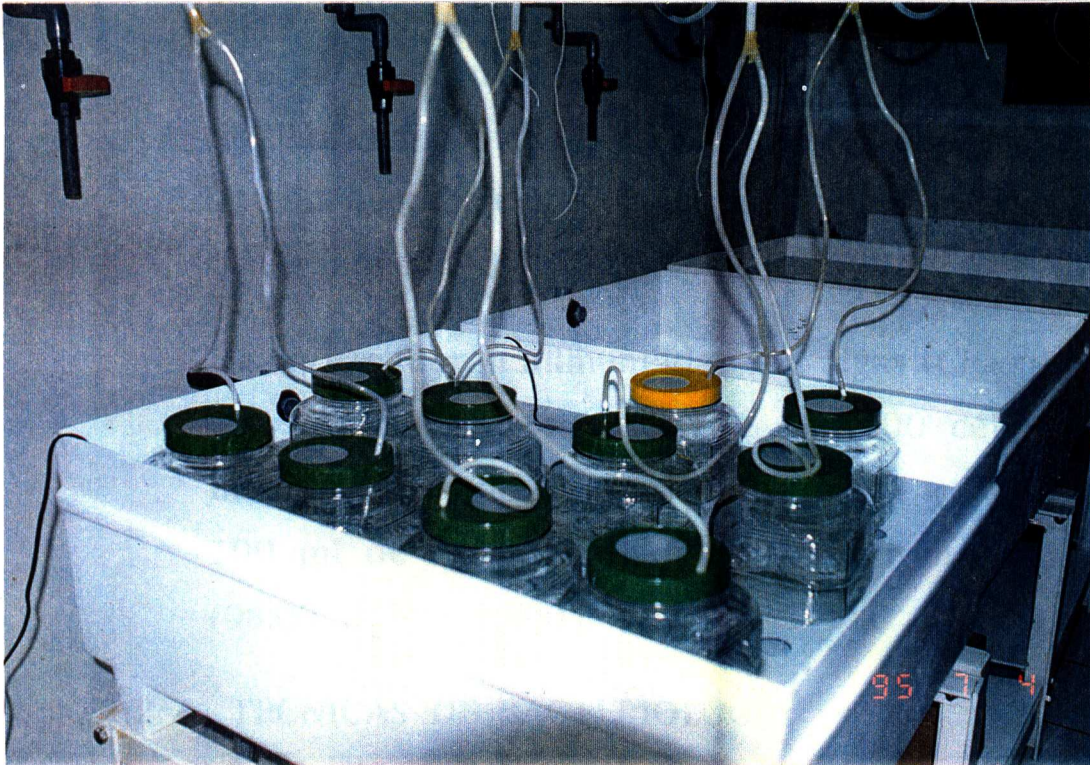


Fig. No. 6. Sistema utilizado para las infecciones experimentales.

Las bacterias se inocularon un día después de la siembra con el fin de recuperar a las larvas del estrés causado por la transferencia.

Fue necesario recambiar el agua de las botellas para eliminar las bacterias que no se fijaron a las larvas, a pesar de que en este estadio la renovación de agua no



es realizada en los laboratorios comerciales debido a la fragilidad de los animales.

Se colocó en cada botella un pedazo de manguera de 4 cm de diámetro con malla de 100 micras en la parte inferior, en la que se introdujo una manguera de 4 mm de diámetro con la cual se succionaba el agua. Este sistema buscaba evitar un estrés excesivo de las larvas con el sifoneo.

Las larvas fueron alimentadas con algas (*Chaetoceros sp*) a una concentración de 100.000 cél/ ml y microencapsulado (Frippak CAR # 1, 0.1 g diluído en 100 ml de agua destilada) en tres tomas diarias (08:00, 14:00 y 20:00 horas).

## 2.2.2 TECNICAS DE BACTERIOLOGIA

### 2.2.2.1 Preparación de bacterias para infecciones experimentales

Después de su descongelación, las bacterias se sembraron en tubos con 50 ml de caldo LB (Luria Bertani Medium) y se incubaron durante toda la noche a 28 °C en baño María, con agitación constante con el fin de recuperar a las bacterias después de la congelación. De esta suspensión bacteriana se tomaron 5 ml para sembrar en 200 ml de medio LB

enriquecido con 1 % de glucosa (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, USA) y 2 % de C1Na (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 191-01665). Se incubaron durante 8 horas a 28 °C en agitación constante.

Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3000 RPM por 10 minutos (KOKUSAN ENSINKI CO., LTD. modelo H-103 N) y se resuspendió el sedimento en 20 ml de solución salina al 2.5 % de NaCl, incubándolo por 1 hora a 28 °C con agitación constante para reactivar las bacterias. Se realizó la lectura al espectrofotómetro (SHIMADZU UV-2100) a 550 nm de longitud de onda para la cuantificación ( $1 \text{ DO} = 1.2 \times 10^9 \text{ bact/ml}$ ). Después de ajustar para la concentración necesaria, se procedió a infectar a las larvas.

#### 2.2.2.2 Siembra de bacterias para realizar colony-blot

Después de 24 horas de la infección, se tomaron 10 larvas de cada botella, lavándolas con agua de mar estéril para eliminar bacterias superficiales y restos de materia que se encuentren en la cutícula del animal. Una vez

limpias, las larvas fueron maceradas en microtubos Eppendorf y resuspendidas en 100  $\mu$ l de solución salina fisiológica (0.85% NaCl). Esta mezcla se sembró en agar TCBS (DIFCO 0650-01-2) incubando a 28 °C por 8 horas. A continuación se efectuó la cuantificación y la observación de luminiscencia en las cajas Petri y se colocaron las membranas de nitrocelulosa para Colony-blot.

### 2.2.3 TECNICA DE PRUEBAS BIOQUIMICAS

Las cepas bacterianas a analizar (ILI y 158) fueron sembradas para aislamiento en agar TSA (Acumedia Cat. No. 7100) y posteriormente fueron inoculadas en tubos con los respectivos medios para pruebas bioquímicas (Fig. No. 7). Las lecturas se realizaron a las 24, 48, 72 y 168 horas después de la siembra. Es importante mencionar que los cultivos bacterianos que se utilicen deben ser puros y frescos (no mayores de 24 horas).

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las instrucciones del comerciante. En la tabla No. II se indican los principios de los caracteres analizados.

Tabla No. II. Principios de los caracteres morfológicos y bioquímicos analizados en las pruebas bioquímicas.

Morfología	Permite detectar la forma de la bacteria.
Motilidad	Indica la presencia o ausencia de flagelos, se determina con la técnica de la gota pendiente. Para observar la motilidad, el cultivo no debe ser mayor a 24 horas.
Gram	Indica si son Gram (-) o Gram (+) según la estructura de la pared celular y la habilidad de las mismas de retener el cristal de violeta cuando son decoloradas con un solvente orgánico como el etanol.
Catalasa	Indica la presencia de la enzima catalasa que destruye el peróxido de hidrógeno. $H_2O_2 + catalasa \rightarrow H_2O + 1/2 O_2$
Oxidasa	Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima citocromo - oxidasa, que es capaz de reducir el oxígeno.
O - F	Indica el tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo al utilizar la glucosa como sustrato.
Urea	Se basa en la capacidad de ciertos microorganismos para degradar la úrea por medio de la enzima ureasa y producir amoníaco.
Lisina y Ornitina Descarboxilasa Arginina Dehidrolasa	Los aminoácidos agregados al medio basal (Moeller decarboxylase broth base) sirven para detectar la producción de enzimas específicas para estos sustratos. Si el microorganismo produce la enzima apropiada, el aminoácido en el medio es degradado produciendo la amina correspondiente.

MR (rojo de metilo)	Este test mide la acidez producida por una bacteria en crecimiento en el caldo MR - VP.
VP (Voges Proskauer)	La prueba depende de la formación de acetilmetilcarbinoil, el cual es oxidado en medio alcalino en presencia de aire para formar diacetil. Este compuesto reacciona con la creatinina para formar el compuesto de color rosado.
Citrato	Se basa en la utilización del citrato como única fuente de carbono.
Indol	Es utilizado como una herramienta de diferenciación en la fermentación de lactosa en cepas de <i>E. coli</i> .
TSI (Triple Sugar Iron)	Se utiliza para la identificación de bacilos entéricos gram - negativos, basándose en la fermentación de tres azúcares: dextrosa, lactosa y sucrosa, y por la producción de sulfuro de hidrógeno.
Nitrito	Indica la reducción de nitrato a nitrito por la bacteria.
Gelatina	Indica la capacidad de la bacteria de licueficar la gelatina.
SIM (Sulfuro, Indol y Motilidad)	Se lo utiliza para la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno, la formación de indol y la motilidad.
TCBS (Thiosulfate citrate bile sucrose)	Es selectivo para vibrios. Su selectividad está dada por el pH alto y la presencia de sales biliares.

Mac Conkey	Indica si la bacteria puede asimilar la lactosa. Por tratarse de un agar selectivo, indica que la bacteria puede ser de la familia de los Coliformes o de las Enterobacterias.
Cetrimide	Es un medio selectivo para el aislamiento e identificación de Pseudomonas aeruginosa.
Pruebas de fermentación de carbohidratos	Indican la capacidad de la bacteria de fermentar el carbohidrato presente en el medio (manitol, mioinositol, dextrosa, manosa, sucrosa, sorbitol, glicerol, galactosa, xilosa, arabinosa, trehalosa, celobiosa, lactosa, melibiosa, fructosa, adonitol, glicerol).
Acetato diferencial	El cambio de coloración del medio indica la utilización del acetato presente en el medio como única fuente de carbono.
Pruebas de halofilia	Salinidades de 0 %, 3 %, 6 %, 8 %, 10 %. La presencia de turbidez en el caldo incubado indica crecimiento bacteriano con tolerancia a la concentración de ClNa.
O/ 129	La sensibilidad a O/ 129 es ampliamente reconocida como una propiedad de los vibrios y es extremadamente valorable en la diferenciación de vibrios de otros bacilos Gram - negativos, especialmente aeromonas.



Fig. No. 7. Pruebas bioquímicas.

#### 2.2.3.1. Siembra de bacterias para pruebas bioquímicas

La siembra depende del medio de cultivo. Para las pruebas bioquímicas se utilizaron medios líquidos: lisina (Wako<sup>®</sup>), ornitina (Wako<sup>®</sup>), arginina (Wako<sup>®</sup>), indol (Difco<sup>®</sup>), nitrato (Difco<sup>®</sup>), caldo MR-VP (Difco<sup>®</sup>), agua de peptona (para pruebas de halofilia) (Difco<sup>®</sup>), semisólidos: OF (Difco<sup>®</sup>), gelatina (Difco<sup>®</sup>), dextrosa (Difco<sup>®</sup>), sacarosa (Difco<sup>®</sup>), manitol (Baker<sup>®</sup>), mioinositol (Difco<sup>®</sup>), sorbitol (SIGMA<sup>®</sup>), glicerol al 87 % (Merk<sup>®</sup>), sólidos: urea (DIFCO<sup>®</sup>), TSI (Nissui<sup>®</sup>), citrato de Simmons (DIFCO<sup>®</sup>), cetrimide (DIFCO<sup>®</sup>), TCBS

(DIFCO®), Mac Conkey (DIFCO®), ACD (DIFCO®) y SIM (DIFCO®).

Para inocular en medios líquidos y semisólidos, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0.85 % de NaCl. Se tomó una colonia con un asa de platino a partir de la siembra en agar general (TSA, Nutrient agar, Beef Heart Infusion agar). No es recomendable tomar la bacteria a partir de un agar selectivo porque pueden obtenerse resultados falsos que interfieran con una correcta identificación bioquímica.

De la suspensión se tomaron 0.5 ml para inocular en los medios: líquidos y semisólidos. Para observar si existe crecimiento en condiciones anaerobias, se colocó aceite mineral en los tubos de OF, lisina, arginina y ornitina.

En los medios sólidos en pico de flauta tales como: urea, TSI, citrato de Simmons, TCBS, Mac Conkey, cetrimide y acetato diferencial, la siembra se efectuó con el asa de platino en punta. Sobre la superficie del medio se trazó una línea recta y, sobre ella un estriado. Para



la siembra en SIM, se introdujo el asa en punta en el centro del agar sin tocar el fondo ni las paredes del tubo.

Para la prueba de oxidasa, se tomó una colonia bacteriana con un asa de platino, frotándola en papel reactivo (Cytochrome-oxidase reagent "Nissui", Yaku Code 05180). En la prueba para catalasa, se adicionó una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a un inóculo bacteriano. En esta prueba, se utilizó un palillo de madera estéril, porque el asa de platino puede inducir a falsos-positivos.

Para la lectura de resultados, es necesario adicionar reactivos para obtener una respuesta a los siguientes medios:

**MR (rojo de metilo):** Se colocan de 5-6 gotas de rojo de metilo por cada 5 ml de cultivo. La lectura del resultado se hace inmediatamente.

**V P (Voges Proskauer):** Se adicionan 600  $\mu$ l de solución #1 (alpha naphthol, 5g; alcohol absoluto, 100 ml) y 200  $\mu$ l de solución #2 (solución de KOH al 40 %). La lecturas de los resultados se efectúan después de 4 horas de la adición del reactivo.

**Indol:** Después de 24-48 horas del inóculo bacteriano, se adicionan 200-300  $\mu$ l del reactivo de Kovac. El resultado de la reacción es instantáneo.

**Nitrito:** Se agrega al medio el reactivo #1 (ácido sulfanílico 1g, ácido acético 5 N, 125 ml) y el reactivo #2 (N-(1-naphthyl) ethylenediamine) o el reactivo #3 (alpha-naphthol 1 g, y ácido acético 5 N). La lectura se hace inmediatamente.

**Gelatina:** Después de 24 horas de inocular la bacteria en el medio, se coloca el tubo en baño María a 22 °C durante 10 minutos para observar la coagulación o no coagulación de la gelatina.

#### 2.2.4 TECNICAS INMUNOLOGICAS

Técnica de Colony blot (Protocolo según Evelyne Bachère (1992), con modificaciones a la técnica descrita en la tesis de Edward Donoso - Espol).

##### 2.2.4.1 COLONY BLOT

Se realizó un cultivo bacteriano de 6 - 8 horas en cajas Petri con agar TCBS. Se colocaron las membranas de nitrocelulosa (S&S NC™ de 82.5

mm de diámetro, con poros de 0.45 micras) en la superficie del agar sobre las colonias durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se dejaron secar por 30 minutos y se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

Las membranas con las bacterias fueron incubadas con PBS - leche descremada al 5 % agitando suavemente por 45 minutos a temperatura ambiente para bloquear la membrana. Después se realizaron 2 lavados de 3 minutos cada uno, con PBS - Tween 20 al 1% (Fig. No. 8).

Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales (2C9, 9H4 ó 2B6) por 2 horas a temperatura ambiente, diluïdos en una solución de PBS - leche descremada al 0.5 % - Tween 20 al 1 %, después de lo cual se efectuaron 3 lavados de 3 minutos cada uno, con PBS - Tween 20 al 1%. A continuación se incubaron con un segundo anticuerpo anti-Ig G de ratón (conjugado a la enzima fosfatasa alcalina) por 30 minutos a una dilución de 1/10.000 en PBS - leche descremada al 0.5 % - Tween 20 al 0.1 %. Se efectuaron 3 lavados de

3 minutos cada uno, con PBS - Tween 20 al 1 % para eliminar segundos anticuerpos no fijados que pudieran dar resultados falsos positivos.

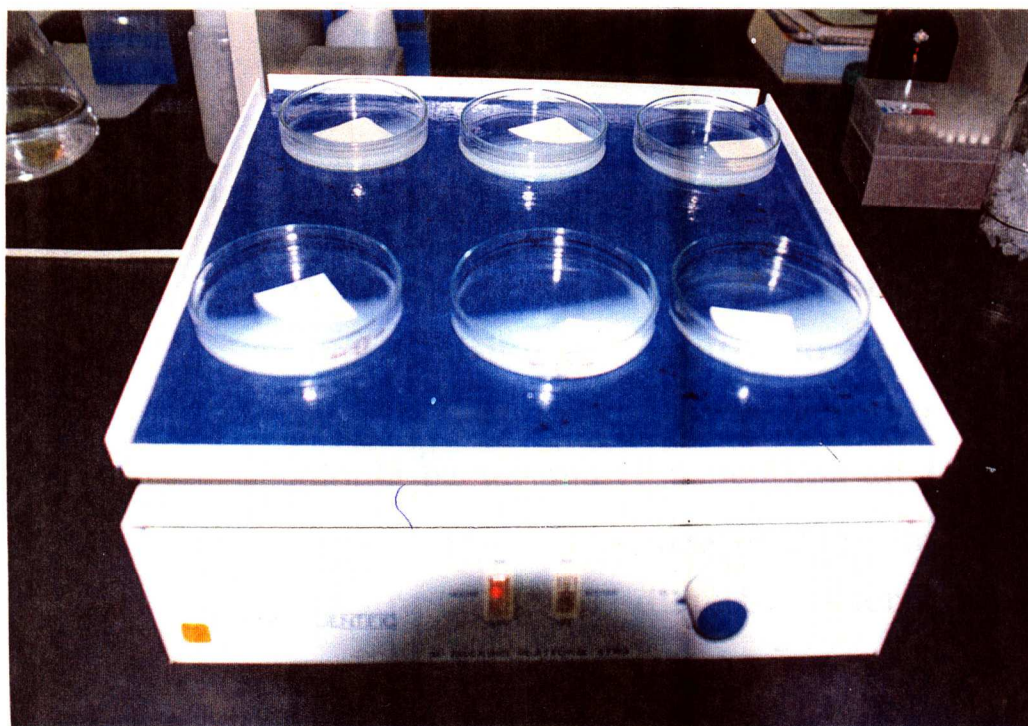


Fig. No. 8. Colony blot. Incubación de membranas con solución bloqueadora.

Finalmente, las membranas fueron incubadas en oscuridad con la solución sustrato preparada al momento:

BCIP .....33 $\mu$ l

(Bromo - 4 Cloro - 3 Indolil fosfato)

NBT.....66 $\mu$ l

(Nitroblue Tetrazolium)

Tampón de fosfatasa alcalina .....10 ml

Una vez que las manchas alcanzaron la intensidad deseada, la reacción enzimática fue detenida lavando la membrana con EDTA 2 mM (100  $\mu$ l de EDTA 0.5 M diluído en 25 ml de PBS).

#### 2.2.4.2 DOT BLOT

Al igual que el colony-blot, consiste en el reconocimiento de un antígeno específico por un anticuerpo monoclonal a partir de una colonia bacteriana resuspendida en 100  $\mu$ l de tampón PBS. Se realiza el depósito de cada muestra (1  $\mu$ l de la dilución bacteriana) en la membrana de nitrocelulosa. Los siguientes pasos son iguales a los descritos en la técnica de colony-blot.

#### 2.2.5 TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Las técnicas descritas a continuación son de acuerdo a los protocolos del manual: "Molecular Cloning" (Sambrook *et al.*, 1989).

Estas técnicas fueron utilizadas para extraer el ADN de la bacteria y analizar mediante electroforesis en gel

de agarosa la presencia de plásmidos. Las cepas caracterizadas fueron "ILI" y "158".

#### 2.2.5.1 EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO

- Método de lisis alcalina: Miniprep (Protocolo según Birnboim, 1983; He *et al.*, 1991; Holmes y Quigley, 1981)

Se realizó un cultivo bacteriano de las cepas ILI y 158 hasta la saturación, en 50 ml de medio LB estéril (enriquecido con 2 % de ClNa y 1 % de glucosa, ver anexo 1) a 28 °C. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 3200 RPM por 5 minutos y se resuspendió el sedimento en 2 ml del sobrenadante (para concentrar a las bacterias en un volumen menor). Se tomaron 1.5 ml de cada suspensión bacteriana para microcentrifugar 2 veces por 25 segundos (microcentrífuga HERAEUS Sepatech Biofuge 13). El sedimento fue resuspendido en 100 µl de solución GTE (anexo 1) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la ruptura de la pared celular, quedando el protoplasto compacto.

El protoplasto fue lisado añadiendo 200 µl de solución NaOH/ SDS (anexo 1) que se

mezclaron invirtiendo el tubo 10 veces e incubando sobre hielo (5 minutos).

Para neutralizar la lisis bacteriana, se adicionaron 150  $\mu$ l de solución de acetato de potasio, pH 4.8, 5 M, (anexo 1), mezclando inmediatamente e incubando 5 minutos sobre hielo. Se microcentrifugó por 3 minutos para sedimentar a las proteínas y los restos de bacterias, quedando en el sobrenadante sólo los ácidos nucleicos que fueron transferidos a un tubo nuevo. Se añadieron 800  $\mu$ l de etanol al 100 % para precipitar ácidos nucleicos y 1  $\mu$ l de glicógeno (para ayudar al alcohol a precipitar los ácidos nucleicos), dejando a temperatura ambiente por 2 minutos.

Se microcentrifugó durante 3 minutos para extraer el etanol. El sedimento fue lavado con 1 ml de etanol al 70 %, microcentrifugado, secado al vacío, y resuspendido en TE (anexo 1).

Para eliminar ARN se utilizó la enzima ARNasa. Esta enzima debe ser almacenada a -20 °C.

En cada tubo que contenía ácido nucleico se añadió 1  $\mu$ l de ARNasa a una concentración de 10 mg/ ml, incubando a 37 °C por 1 hora.

- **Cuantificación de ADN**

La concentración de ADN obtenida, se determinó mediante espectrofotometría (Pharmacia, 80-2103-98) utilizando la propiedad de las bases púricas y pirimídicas de absorber las radiaciones ultravioletas a 260 nm.

Una unidad óptica a 260 nm corresponde a una solución de ADN bicatenario de 50  $\mu$ g/ ml.

Como las proteínas poseen el pico de absorbancia a 280 nm, para determinar si existe una contaminación proteica se efectúa un control de densidad óptica comparando la razón  $DO_{260} / DO_{280}$  que tiene que situarse entre 1.8 y 2.0 para tener un ADN puro.

- **Digestión con enzimas de restricción**

El ADN plasmídico fue sujeto a digestiones con enzimas de restricción para establecer un perfil de restricción.



Para la digestión se diluyó el ADN en un volumen final de 30  $\mu$ l con 1  $\mu$ l de enzima y 3  $\mu$ l de tampón 10 X, dejando en incubación por 2 horas a 37 °C.

- **Electroforesis en gel de Agarosa**

Efectuadas las digestiones con las diferentes enzimas: Alu, Bam, Eco RI y Hha, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar los distintos fragmentos obtenidos en función de su tamaño.

Se preparó un gel de agarosa (GIBCOBRL Life Technologies, No. EM 3202) al 1% en TAE 1X disolviendo la agarosa por ebullición. La solución se enfrió hasta 60 °C y se añadió Bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ ml para la visualización de ADN en la mesa de UV.

En el molde se colocó inmediatamente la solución agarosa dejándola enfriar al ambiente unos minutos. Se insertó el peine en el gel para crear los pozos donde se colocan las muestras de ADN (La peñilla no debe tocar el fondo de la cubeta) y, se puso en refrigeración hasta su completo endurecimiento.

El gel fue colocado en la cubeta de electroforesis y cubierto completamente con el tampón TAE 1X (anexo 1). Se prepararon las muestras de ADN con una apropiada cantidad de tampón de depósito 10X y se depositaron en los pozos con una micropipeta (GILSON L11595G). Para poder determinar los tamaños de los fragmentos obtenidos, se corrió simultáneamente una muestra de marcadores que contiene 8 fragmentos (ADN del bacteriófago lambda digerido con Hind III) con los siguientes números de pares de bases: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125.

En la electroforesis, se produce la migración del ADN (cargado negativamente) hacia el ánodo o polo positivo, a 1 - 10 V/ cm del gel (Fig. No. 9). Para la electroforesis el tinte azul de bromofenol del buffer de depósito (ver anexo 1) debe migrar lo suficiente para que los fragmentos de ADN estén bien separados. Una vez que el ADN ha migrado, la observación se efectúa en la mesa de UV.

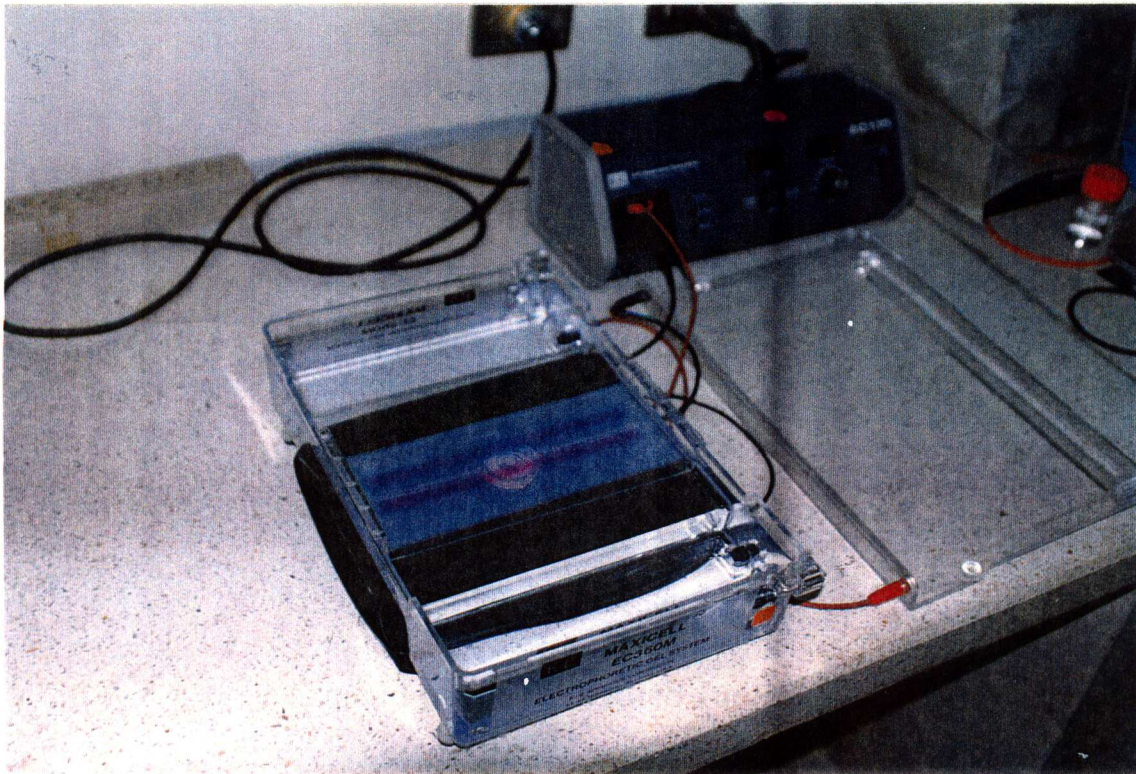


Fig. No. 9. Electroforesis. Migración de ADN (carga negativa) hacia el ánodo o polo positivo.

#### 2.2.5.2 Purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de electroforesis (kit GeneClean)

Los fragmentos a purificar son recuperados cortando el gel de agarosa bajo iluminación en la mesa de UV. Se colocaron en microtubos eppendorf para ser pesados (balanza METTLER AE 240). Se toma en cuenta la siguiente relación para calcular el volumen de muestra que hay:  $1 \text{ g} = 1 \text{ ml}$ .

Se incubó a 45 °C durante 5 minutos con una solución de NaI (para eliminar la agarosa) en conjunto con polvo de vidrio (Glassmilk) con gran fuerza iónica permitiendo así la absorción de ADN (se añaden 5 µl de Glassmilk/µg de ADN). Se centrifugó a 13000 RPM por 25 segundos dos veces para precipitar el *glassmilk*. El sobrenadante se desechó y se tomó el sedimento que debe estar completamente seco.

El polvo de vidrio fue lavado 3 veces con una solución de lavado (New Wash) para eliminar restos de agarosa e impurezas, centrifugando después de cada lavado, 2 veces a 13000 RPM por 25 segundos. Después de la última centrifugación, el ADN es recuperado a baja fuerza iónica en tampón TE (Tris-EDTA) (anexo 1), posteriormente se incubó durante 2-3 minutos en baño María a 52 °C y se centrifugó durante 30 segundos a 13000 RPM para separar el ADN del *glassmilk*. Se tomó la *suspensión con ADN* y se almacenó a - 20 °C hasta sus utilización,

Con el ADN purificado (Geneclean), fueron creadas dos sondas (III y IV) por el

departamento de Genética para el reconocimiento de ADN plasmídico de la cepa 158 mediante la técnica de Southern blot.

#### 2.2.5.3 Southern Blot

Consiste en la transferencia de ADN desde un gel de agarosa hacia una membrana de nylon o nitrocelulosa, lo cual permite analizar los patrones electroforéticos con sondas nucleicas específicas.

- Digestión del gel

Se cortó la parte del gel que se iba a hibridar sobre la membrana y se sumergió en solución desnaturizadora (anexo 2) durante 45 minutos a temperatura ambiente agitando suavemente. La incubación desnaturaliza el ADN (separa las cadenas) antes de la transferencia. Se lavó el gel en agua desionizada.

- Neutralización

Se incubó durante 30 minutos en solución neutralizadora (anexo 2) con agitación suave a temperatura ambiente (esta solución elimina las sales presentes en el gel).

- **Preparación del sistema de transferencia**

Durante la neutralización se cortó un pedazo de membrana del tamaño del gel.

En una cubeta se puso la solución de transferencia 10X SSC (anexo 2). Se mojó una banda de papel Whatman, que sirve en la transferencia de la solución a través de la membrana, y se la depositó sobre el soporte dejando las extremidades en la solución. Se colocó el gel y sobre éste la membrana cubriéndola con dos pedazos de papel Whatman del tamaño del gel después de haberlos mojado en una solución de 2X SSC. Una serie de papeles absorbentes y un peso (para comprimir) fueron colocados encima. La operación de transferencia tomó 6.5 horas. (Fig No. 10).

La membrana se lavó en buffer 5X SSC por 5 minutos a temperatura ambiente para remover los restos del gel y contaminantes particulares que fueron introducidos como resultado del proceso de transferencia.

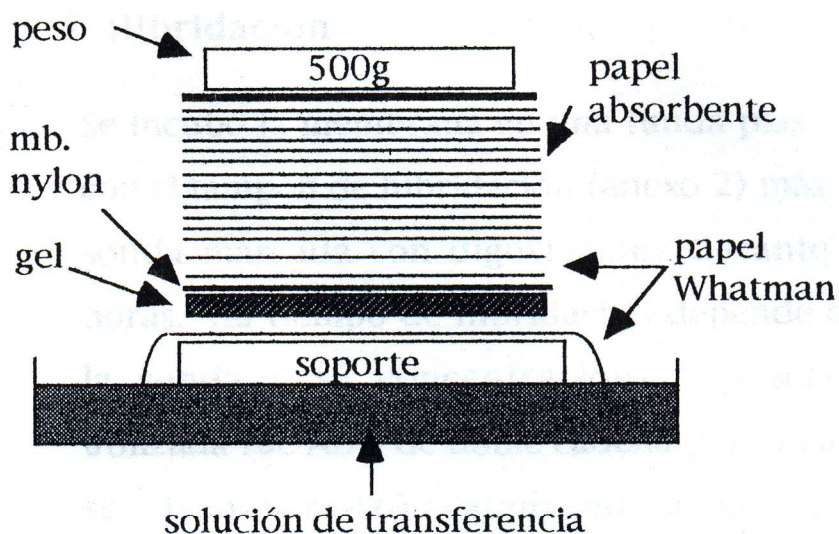


Fig. No. 10 Southern blot. Transferencia de ADN hacia una membrana de nylon.

- Fijación del ADN sobre la membrana

Se colocó la membrana húmeda sobre una pieza de papel toalla y se fijó el ADN a la membrana mediante radiación UV, en horno U.V. crosslinker (SPECTROLINKER XL-1000).

- Prehibridación

Antes de realizar la hibridación, la membrana se introdujo en una funda plástica que contenía 20 ml de solución de prehibridación (anexo 2) por 100 cm<sup>2</sup> de área de membrana. Se selló la funda y se prehibridizó a la temperatura de hibridación, 65 °C, por 2 horas.

- **Hibridación**

Se incubó la membrana en una funda plástica con el tampón de hibridación (anexo 2) más la sonda marcada con digoxigenina durante 3 horas. (El tiempo de hibridación depende de la sonda y su concentración). La sonda utilizada fue ADN de doble cadena por lo cual se desnaturalizó calentándola en agua hirviendo por 10 minutos previo a la hibridación y fue enfriada rápidamente a -20 °C para evitar que las cadenas se unan nuevamente.

Antes del revelado, se efectuaron 2 lavados. El primer lavado se hizo con una solución 2X SSC; SDS 0.1 % (anexo 2) a temperatura ambiente durante 5 minutos, repitiéndolo una vez más. El segundo lavado, se efectuó 2 veces de 15 minutos cada uno en una solución de 0.1X SSC; SDS 0.1% (anexo 2) a 68 °C.

- **Revelado**

Se lavó la membrana 1 minuto en el tampón 1 (anexo 2) y se incubó durante 30 minutos con el tampón 2 (anexo 2).



Se removió el tampón 2 y se incubó la membrana 30 minutos con la solución de anticuerpo conjugado diluida: diluir Ac conjugado 150 mU/ml (solución madre 200 $\mu$ l a la concentración de 750 U/ml a 4°C) en el tampón 2 (estable 12h a 4°C).

Para remover los anticuerpos se lavó la membrana 2 veces con tampón 1 durante 15 minutos.

Se equilibró la membrana durante 2 minutos con tampón 3 (anexo 2). Para el revelado de la señal, se incubó la membrana en una funda plástica con la solución de coloración (anexo 2) manteniéndola en un lugar obscuro.

Para parar la reacción se lavó la membrana durante 5 minutos con el tampón 4 (anexo 2).

TABLA No. III. morfológicos  
Bioquímicos de dos cepas de V. alginolyticus  
de Bergoy)

## CAPITULO III.

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 CARACTERIZACIONES

##### 3.1.1 CARACTERIZACION BIOQUIMICA

La caracterización bioquímica corresponde a la metodología de referencia para describir y reconocer aislados de bacterias. La taxonomía bacteriana descansa esencialmente en estos tipos de criterios que son absolutamente necesarios para iniciar cualquier trabajo de investigación en bacteriología. Teniendo en cuenta los criterios de caracterización de vibrios para las especies actualmente descritas, una serie de pruebas bioquímicas fue realizada paralelamente para las cepas III y 158.

La interpretación de las pruebas bioquímicas (Tabla No. III) de las cepas III y 158 de acuerdo al manual de Bergey indicaron que estas bacterias pertenecen al género *Vibrio*, especie *V. alginolyticus*.

TABLA No. III. Caracteres morfológicos y bioquímicos de dos cepas de *V. alginolyticus* comparadas con los caracteres de *V. alginolyticus*, según el Manual de Bergey (Holt et al, 1994).

CARACTERES	<i>V. alginolyticus</i>	Cepa ILI	Cepa 158
	(Manual de Bergey)		
<b>C. MORFOLOGICOS</b>			
Forma	bacilo	bacilo	bacilo
Gram	-	-	-
Motilidad	+	+	+
<b>C. BIOQUIMICOS</b>			
Catalasa	D	+	+
Oxidasa	+	+	+
O-F	+	+	+
Urea	-	-	-
Lisina	+	+	+
Arginina	-	-	-
Ornitina	d	-	-
MR	d	-	+
VP	+	+	-
Citrato	-	-	-
Indol	(+)	+	-
TSI	ácido	ácido	ácido
Nitrito	+	+	+
Gelatina	+	+	+
SIM	-	-	-
TCBS	+	+	+
MacConkey	-	+/-	+/-
Cetrimide	-	-	-
Acetato diferencial	-	-	-
Dextrosa	+	+	+
Manitol	+	+	+
Mioinositol	-	-	+
Sucrosa	+	+	+
Sorbitol	-	-	-
Glicerol	(+)	+	+
Salinidad 0 %	-	-	-
Salinidad 3 %	+	+	+
Salinidad 6 %	+	+	+

Salinidad 8 %	+	+	+
Salinidad 10 %	+	+	+

- +: 90 - 100 % de las cepas, son positivas.
- : 0 - 10 % de las cepas, son positivas.
- (+): 76 - 89 % de las cepas, son positivas.
- (-): 11 - 25 % de las cepas, son negativas.
- d: 26- 75 % de las cepas son positivas.
- D: Diferentes reacciones pueden darse en diferentes clasificaciones (especies de un género o género de una familia).

### 3.1.2 CARACTERIZACION GENETICA

La caracterización genética de cepas bacterianas puede consistir en diferentes ensayos como los descritos en el capítulo Antecedentes. Debido a la facilidad tecnológica y a la posible significación biológica, el análisis genético estuvo enfocado a la puesta en evidencia y la caracterización de plásmidos.

Mediante la extracción del ADN total de la cepa ILI, se demostró que esta bacteria carece de plásmidos y solamente se visualizó ADN cromosómico en el gel de agarosa (Fig. No. 11).

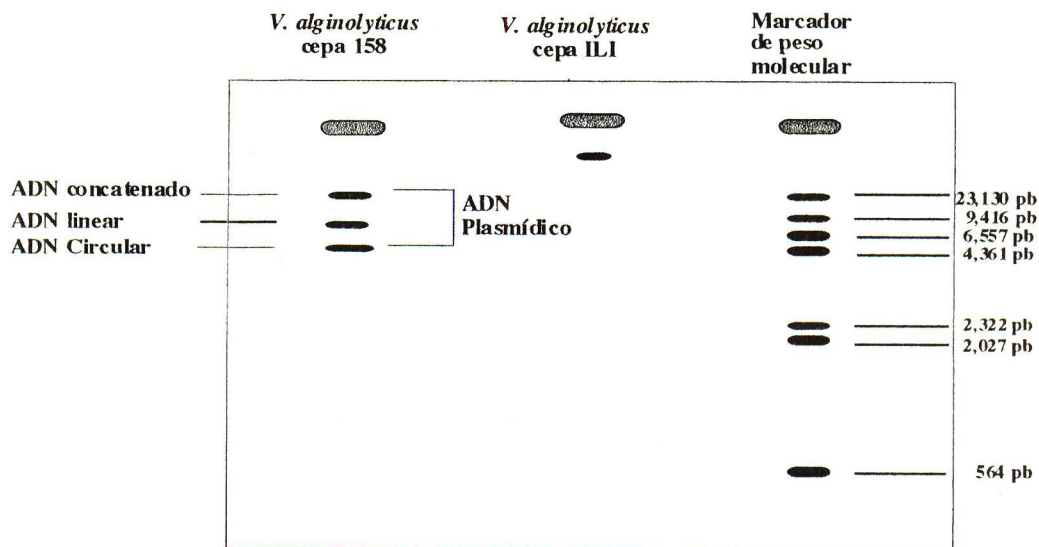


Fig. No. 11 ADN de las cepas ILI y 158. En ILI se observa ADN cromosómico mientras que en la cepa 158 se visualiza la presencia de un plásmido en tres formas aparentes (concatenado, linear y circular).

Al contrario, la cepa "158" mostró un patrón electroforético de 3 bandas (I, II y III, con tamaños aparentes de 23.13 Kb, 7.4 Kb y 4.9 Kb respectivamente), mientras que una última banda en posición cuatro (2.2 Kb) aparece ocasionalmente en las distintas extracciones. Para comprender las relaciones entre estas bandas, en un primer tiempo fueron purificados las bandas III y IV, que estaban en mayor cantidad. La purificación de la banda III condujo después de electroforesis, a reidentificar las cuatro bandas. Por el contrario, la purificación de la banda IV nunca permitió la observación de bandas suplementarias después de electroforesis. A la vista de estos resultados, dos hipótesis podrían ser

consideradas. La primera, que existen dos plásmidos, uno presente en sus diferentes formas I, II, III y el otro en una forma, IV. La segunda hipótesis, más probable sería la existencia de un único plásmido, en las formas I, II, III, y IV. La forma IV del plásmido sería un producto de la extracción a partir del cual no se pueden obtener las formas restantes. Para estudiar estas hipótesis, dos sondas nucleicas fueron preparadas a partir de la bandas III y de la banda IV. Las pruebas de hibridación mostraron la presencia de reacciones cruzadas entre las sondas y las distintas bandas, indicando que la cepa 158 tenía un solo plásmido susceptible de estar presente en 4 diferentes formas dependiendo del protocolo de extracción utilizado. Refiriéndonos al manual del Kit Qiagen, se asumió que las bandas I, II, III, IV, correspondían a las formas: concatenada (I), linear (II), circular(III), y superenrollada simple cadena (IV).

El patrón de restricción del plásmido de la cepa 158 fue establecido para las enzimas Eco RI, Bam HI, Alu I y Hha (Fig. No. 12).

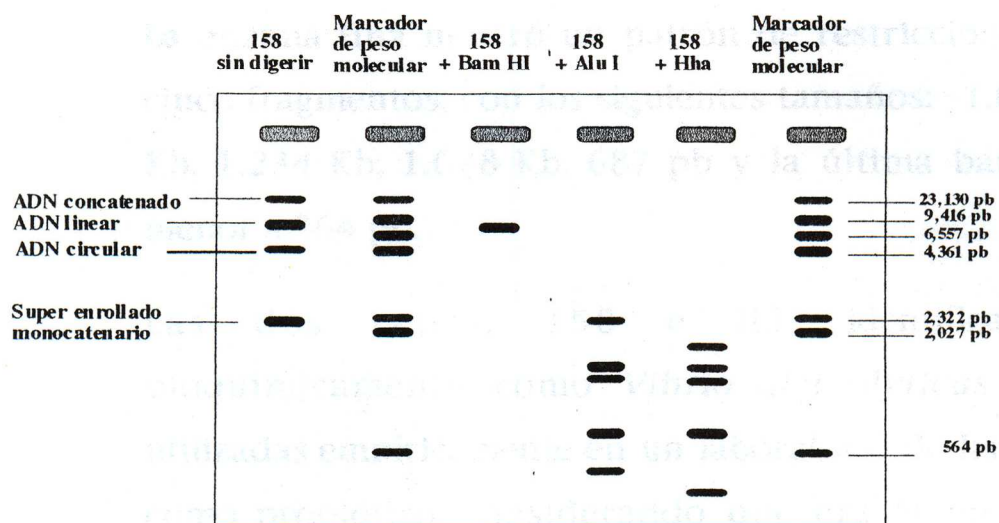


Fig. No. 12 Patrón de restricción de la cepa 158. La primera columna corresponde al ADN sin digerir y las siguientes a ADN digerido con las enzimas Eco RI, Bam HI, Alu I y Hha respectivamente.

Con Eco RI se observaron dos bandas de 4.4 y 2.21 Kb, en igual posición a las encontradas en el plásmido no digerido, lo que indica que esta enzima no corta al plásmido.

Al cortar el plásmido con Bam HI se produce una linearización del mismo, encontrándose una banda de 7.4 Kb.

La digestión con Alu I mostró cinco fragmentos de 1.2 Kb, 1.1 Kb, 680 pb y los dos últimos menores a 564 pb, menor peso del marcador utilizado, por lo cual no fue posible estimar los tamaños de estas dos bandas.

La enzima Hha mostró un patrón de restricción de cinco fragmentos, con los siguientes tamaños: 1.6 Kb,

La enzima Hha mostró un patrón de restricción de cinco fragmentos, con los siguientes tamaños: 1.623 Kb, 1.234 Kb, 1.028 Kb, 687 pb y la última banda menor a 564 pb.

Las dos cepas, 158 e III, identificadas bioquímicamente como *Vibrio alginolyticus* y utilizadas empíricamente en un laboratorio de larvas como probiótico, considerando que era la misma bacteria, mostraron finalmente diferencias genéticas, al menos, en la presencia/ausencia de un plásmido.

### 3.1.3 CARACTERIZACION E IDENTIFICACION ANTIGENICAS

Las bacterias son microorganismos fuertemente inmunógenos cuando son inyectados en vertebrados, lo que significa que es posible tener anticuerpos que reaccionan con antígenos bacterianos. Los inmunosueros, conteniendo anticuerpos de tipo policlonales y por tanto poliespecíficos, no son adecuados para distinguir dos cepas de una misma especie bacteriana, debido a que su composición antigénica es muy similar. Al contrario, los anticuerpos monoclonales y por tanto monoespecíficos de un antígeno pueden constituir reactivos muy resolutivos para reconocer dos cepas estrechamente relacionadas.



Con esta perspectiva, fue utilizada una colección de anticuerpos monoclonales preparados con la cepa ILI y seleccionados en base a su ausencia de reactividad frente a otras especies de vibrios. La reactividad de los anticuerpos fue realizada con una prueba de tipo dot-blot. Los resultados condujeron a reconocer diferencias antigénicas entre las cepas ILI y 158 mediante el anticuerpo 2B6 (Tabla No. IV). Estos resultados muestran el gran interés de utilizar criterios antigénicos para caracterizar las bacterias ya que permite reconocer fácilmente dos cepas de una misma especie aisladas de un mismo laboratorio.

TABLA No. IV. Listado de dieciséis hibridomas, tres reconocen a las cepas ILI y 158 y trece reconocen sólo a la cepa ILI.

HIBRIDOMA	ILI	158
2 B6	+++	
2 G1	+++	
2 H5	+++	
4 E1	++	
12 E6	+++	++
12 G6	++	++
13 F3	++	
13 G6	++	
14 A1	++	
14 D4	++	
14 G7	++	
14 H7	+++	
15 B5	++	
15 E2	++	
15 D11	++	
19 G4	+++	+

Tomando en cuenta la estricta especificidad del anticuerpo 2B6 para la cepa ILI, fue escogido para desarrollar una prueba inmunológica de tipo colony-blot que era una herramienta necesaria para analizar *in vivo* las interacciones entre bacterias probiótica y patógena. El colony-blot es una prueba particularmente conveniente para reconocer colonias correspondientes a una cepa entre una mezcla bacteriana. Para analizar las interacciones *in vivo* es importante reconocer específicamente la bacteria probiótica y la bacteria patógena y cualquier otra bacteria presente en el tubo digestivo del animal experimental. El uso en paralelo de una prueba colony-blot específica de la bacteria probiótica y de otra específica de la bacteria patógena, permite reconocer colonias correspondientes a cada una de estas bacterias y, por deducción, las colonias correspondientes a las bacterias presentes en el tubo digestivo del animal experimental.

La prueba colony-blot fue relativamente fácil de desarrollar de acuerdo con las numerosas referencias existentes en esta área, consistiendo el trabajo en optimizar las concentraciones de anticuerpos primario y conjugado, y determinar el momento óptimo del cultivo de colonias que permita obtener señales

tiempo de incubación en el agar de más de 8 horas. Todos los controles, en cuanto a anticuerpos y cepas bacterianas fueron impecables, en particular las bacterias de la cepa 158 y la E22 (posiblemente patógena) no mostraron reacción con la prueba colony-blot.

### 3.2 ANALISIS DE LAS INTERACCIONES *in vivo* ENTRE BACTERIAS "PROBIOTICAS" Y PATOGENAS

Las cepas utilizadas en las interacciones, ILI y E22, como posibles probiótico y patógeno respectivamente, fueron escogidas en base a los siguientes antecedentes:

Las cepas ILI y 158 fueron utilizadas como probiótico en un laboratorio de larvas, la primera fue usada durante varias corridas con éxito relativo, no así la cepa 158 que fue aislada cuando se presentaron problemas en los tanques de cultivo del laboratorio. Para establecer la cepa que se utilizaría como probiótico en el modelo de estudio *in vivo*, un primer experimento fue realizado en el cual se evaluaron estas cepas en términos de patogenicidad o inocuidad, no encontrándose diferencias entre ellas. De acuerdo a estos resultados y, tomando en cuenta el comportamiento de estas cepas durante las corridas, los trabajos posteriores fueron realizados con la cepa ILI.

La cepa E22 fue aislada durante problemas de mortalidades con síndrome de tipo "bolitas" y su carácter patógeno fue estudiado en infecciones experimentales realizadas anteriormente (Aráuz, 1994). Así también, se cuenta con dos anticuerpos monoclonales que reconocen a esta bacteria (9H4 y 2C9).

Una vez establecidas las cepas, fueron posteriormente utilizadas para analizar sus interacciones sobre la base de infecciones experimentales de larvas en el estadio de zoea 1. Este estadio fue conscientemente seleccionado debido a que en este momento las larvas son muy susceptibles a infecciones bacterianas, además en este estadio las larvas abren la boca y se puede iniciar el proceso de colonización del tubo digestivo por las bacterias presentes en el medio. Consecuentemente, es un estadio adecuado para realizar infecciones experimentales con bacterias con el propósito de determinar su patogenicidad, inocuidad o su capacidad de inhibir a bacterias patógenas mediante un proceso de tipo probiótico.

El principio de los análisis consiste en una serie de observaciones secuenciales, aunque no todas fueron realizadas en todas las experimentaciones : (i) la observación microscópica de los animales para detectar anomalías y en particular síntomas de tipo "bolitas", (ii) determinación de la actividad de las larvas, presencia de luminiscencia y