UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

"ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE PRODUCTOS PROBIÓTICOS COMERCIALES EMPLEADOS EN LA LARVICULTURA DE CAMARÓN *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei,* USANDO UNA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS MOLECULAR, PCR-DGGE."

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

CECILIA NELLY TOMALÁ BELTRÁN

LA LIBERTAD – ECUADOR

2011

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENINSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÌA MARINA

"ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE PRODUCTOS PROBIÓTICOS COMERCIALES EMPLEADOS EN LA LARVICULTURA DE CAMARÓN *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei,* USANDO UNA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS MOLECULAR, PCR-DGGE."

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÒLOGO MARINO

CECILIA NELLY TOMALÁ BELTRÁN

LA LIBERTAD – ECUADOR

2011

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL)."

Cecilia Nelly Tomalá Beltrán

TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Gonzalo Tamayo
Decano de la Facultad

Blg. Richard Duque
Director de Escuela de la Facultad

M.Sc. Milton Zambrano
Secretario Procurador

Blga. Angela Reyes
Docente tutor (Delegado)

Q.F. Mery Ramírez
Docente de Área

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su Director por haberme brindado la oportunidad de culminar una etapa de desarrollo profesional.

A M.Sc. Ricardo Cedeño por creer y confiar en mí para la realización de mi tesis, y guiarme con sabiduría y constancia por el camino del conocimiento y enriquecerme no solo como profesional sino como ser humano.

A la M.Sc. Janneth Galarza por sus observaciones y colaboración para el desarrollo de mi tesis.

A todo el Cuerpo docente del CENAIM de manera muy especial a la Oc. Irma Betancourt y M.Sc. Mariuxi Sotomayor, por su profesional asistencia, amistad, conducción y paciencia en el transcurso de vida en Cenaim.

A mis amigas del alma Gabriela Casco, Yessenia Pozo y Cindy Campoverde, amigas incondicionales con cualidades morales y humanas únicas, gracias por su apoyo y por estar siempre en los momentos que más necesite y brindarme todo el respaldo de una sincera amistad.

A todo el personal de Microbiología y Genética: Rosa Malavé, Cristóbal Domínguez y César Gonzabay por permitirme compartir unos minutos de su vida profesional y personal, apoyándome con la mejor dedicación e impetud para culminar este largo camino.

A todos mis amigos que desde afuera me estuvieron alentando y dándome apoyo, expresándome en todo momento su cariño y fe en lo que creo y quiero.

DEDICATORIA

A Dios, por el invaluable regalo de la vida, y por ser mi pilar fundamental, a pesar de mis errores nunca me abandona.

A mis Padres, como agradecimiento a su esfuerzo, amor y apoyo incondicional, durante mi formación tanto personal como profesional

A mis hermanos Leo, Sandra, Mercy, Janneth, y Fanny, por que han sido mis compañeros y mi apoyo en todo momento de mi vida. Gracias manitos nunca los cambiaria por nadie.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS……...……..…. *i*

INDICE DE FIGURAS ……..…… ii

ABREVIATURAS…….……. iii

GLOSARIO……...……. vi

RESUMEN…….……. 1

1.INTRODUCCIÓN…….…..…..... 2

2.OBJETIVOS……...…….. 5

3.HIPOTESIS…….……..……..…. 6

4. ANTECEDENTES

4.1. Uso de antibióticos y sus aplicaciones en la industria camaronera… 7

4.2. Los probióticos como alternativa para mejorar la producción……..... 8

4.2.1 Definicion de probióticos…….…. 8

4.2.2 Mecanismos De Acción De Los Probióticos……..... 11

Exclusión competitiva……..…… 12

Mejoramiento de la nutrición por suministros de nutrientes esenciales……. 12

Mejora en la calidad del agua……...……...……. 13

Efecto antiviral……...…….…...…. 14

Mejoramiento de la respuesta inmune…… 15

4.3 El Ribosoma bacteriano como elemento de estudio para caracterización molecular……..…….. 16

4.3.1 Los Ribosomas y el 16S rDna……..... 16

4.3.2 ARNr 16S ..……...……...……..…. 17

4.3.3 Características relevantes Del ARNr 16S para su utilización como herramienta filogenética y taxonómica ……...……... 20

4.3.4 Aplicaciones de la secuenciación del ARNr 16S en el diagnóstico microbiológico ……..……. 21

4.3.5 Los plásmidos y su importancia en los estudios moleculares… 23

4.4 Identificación Bacteriana mediante la Secuencia 16s rDNA a partir de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) ……...…… 25

4.4.1 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)……...…… 25

4.4.2 Técnicas moleculares como herramientas para la caracterización de productos comerciales……...……..…… 26

4.4.3 Aplicación de la técnica El DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) en identificación bacteriana ….…… 26

Fundamento de la técnica DGGE……...…....…… 26

Aplicaciones del DGGE en la caracterización de comunidades bacterianas…….…….……..… 29

5. MATERIALES Y METÓDOS

5.1. Activación de probiótico…… 36

5.2. Aplicación de técnicas moleculares……... 36

5.2.1. Extracción de DNA de Probióticos…….. 36

5.2.2. Cuantificación de DNA……...…… 37

5.2.3. Purificación del DNA bacteriano……. 38

5.2.4. Amplificación del DNA bacteriano del 16S RNA…….. 38

5.3. Identificación de especies a partir de DGGE……. 40

5.3.1. Electroforesis en geles de agarosa……...…… 40

5.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida……...……. 41

5.3.3. Tinción geles de poliacrilamida (DGGE)……...……. 42

5.3.4. Fotografía y análisis de imagen……...…… 43

5.3.5. Purificación de DNA a partir de geles de poliacrilamida…… 44

5.3.6. Clonaje de bacterias……...…….. 44

5.3.7. Extracción de ADN plasmidico……...…… 45

5.4. Análisis y contraste de especies bacterianas de probióticos comerciales……...…….. 46

5.4.1.Secuenciación……...…… 46

6. RESULTADOS

6.1. Activación de probióticos comerciales..... 47

6.2. Técnicas moleculares para identificación de especies……... 47

6.2.1. Extracción de DNA, amplificación por PCR ……. 47

6.3. Identificación de especies a partir de DGGE……. 49

6.3.1.Análisis en geles de gradiente desnaturalizante de los productos probióticos (DGGE). ……...… 49

6.3.2.Purificación de DNA a partir de geles de poliacrilamida…..... 51

6.3.3. Clonación de bacterias……..…… 53

6.4. Análisis y contraste de especies bacterianas de probióticos comerciales……...…….. 54

6.4.1.Secuenciación……..……...… 54

DISCUSIONES……...……...……. 57

CONCLUSIONES…….…….. 61

RECOMENDACIONES…….……..… 62

BIBLIOGRAFÍA…….……...……. 63

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla # 1.	Activación de productos probióticos comerciales……..	36
Tabla # 2	Concentraciones de la mezcla de PCR……	39
Tabla # 3	Condiciones de amplificación para 16S rDNA bacteriano de las muestras de probióticos……	39
Tabla # 4	Etapas para la tinción con Nitrato de Plata…….	43
Tabla # 5	Reacciones empleada en la clonación…….	44
Tabla # 6	Concentración de ADN bacteriano de los productos probióticos evaluados…….....	48
Tabla # 7	Especies identificadas mediante secuenciación a partir de DGGE……	55
Tabla # 8	Contraste de especies de producto probiótico A……..	55
Tabla # 9	Contraste de especies de producto probiótico B……	56

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura # 1	El ribosoma bacteriano, las subunidades y macromoléculas que lo componen……	17
Figura # 2.	Estructura secundaria del ARNr 16S (tomada de Rodicio,2004)……...	19
Figura # 3	Estructura bacteriana presenta cromosoma bacteriano y DNAextracromosómico o plásmido……..	23
Figura # 4	Gel de electroforesis presenta productos amplificados por PCR…….	48
Figura # 5	Perfiles generados de secuencias de genes de 16S rRNA de aislados de probióticos comerciales (DGGE).	49
Figura # 6.	Perfiles generados de secuencias de genes de 16S rRNA , análisis de imagen……	50
Figura# 7	Cortes de bandas para purificación……	52
Figura# 8	Electroforesis en gel de agarosa (2%) del fragmento (16S rDNA) amplificados por PCR……..	53
Figura# 9	Perfiles generados por clones obtenidos por probióticos comerciales……..……	54

ABREVIATURAS

A	Adenina
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
AgNO3	Nitrato de Plata
bp	Pares de bases
C	Citocina
CLPP	Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad
cm	Centímetro
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
ddH2O	Agua doblemente destilada
DGGE	Electroforesis en geles con gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Desoxiribonucleótidos
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetra acético
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
G	Guanina
G	Gramo
h	Horas
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio

ml	Mililitro
mM	Milimolar
Na OH	Hidróxido de sodio
Na CO3	Carbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nt	nucléotidos
°C	Grados centígrados
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RAPD	Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
rrs	Operones ribosomales
TAE	Tampón tris acetato EDTA
TCBS	Agar tiosulfato citrato sales biliares
TSB	Triptona Soja Caldo
TGGE	Electroforésis en geles con gradiente de temperatura
T – RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales
µl	Microlitro

µg	Microgramo
µM	Micromolar
w/v	Peso / volumen
16S rRNA	Subunidad 16S del RNA ribosómico

GLOSARIO

ADN polimerasa: Cualquier enzima que sea capaz de sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de un ADN patrón

ADN: Acido desoxirribonucleíco, una cadena doble de nucleótidos unidos entre sí (en los que el componente azúcar es la desoxirribosa), que es la molécula fundamental en la transmisión de los genes.

AFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Es un método muy sensible para detectar polimorfismos del ADN. Primero se somete el ADN a digestión con dos enzimas de restricción; luego se selecciona un subconjunto de los fragmentos de ADN que resultan de la digestión para que sean amplificados en la PCR y, finalmente, visualizados.

Aminoácidos: Compuestos orgánicos bifuncionales que contienen un grupo básico amino (–NH 2) y un grupo ácido carboxilo (–COOH).

ARN: Ácido orgánico constituido por unidades de nucleótidos de adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U) que se repiten, cuyos componentes de ribose están unidos con enlaces de tipo fosfodiester.

Base: Unidad química que caracteriza a un nucleótido. En el ADN, las bases son: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). Las bases del ARN son adenina, guanina, uracilo (U) y citosina.

Cebador: Fragmento corto de ADN o de ARN hibridado con un ADN de cadena simple, y al cual pueden agregarse más nucleótidos mediante la polimerasa de ADN.

Conservadas: Las regiones conservadas de un gen son las partes que, con el

tiempo, han acumulado muy pocas mutaciones o cambios en la secuencia de nucleótidos.

Desnaturalización: Es la separación de las dos cadenas de la doble hélice del ADN, o la ruptura severa de una molécula compleja sin que se destruyan los enlaces principales de sus cadenas.

DGGE: Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante. Método para separar fragmentos de ADN según su movilidad en condiciones cada vez más desnaturalizantes (generalmente, por concentración creciente de formamida o de úrea).

Electroforesis: Técnica que separa, los componentes de una mezcla de moléculas (proteínas, ADN, ARN) según su tamaño, como resultado de un campo eléctrico en un gel que sirve de soporte.

Enzima de restricción: Endonucleasa que reconoce como objetivo una secuencia específica y corta la cadena de ADN en ese punto.

Enzima: Proteína que funciona como catalizador de reacciones bioquímicas.

Huella genética: Representación gráfica de determinadas secuencias del genoma que funcionan como un código de barras de la identidad de un individuo.

Marcador: Ubicación física identificable en un cromosoma cuya herencia puede rastrearse (por ejemplo, un gen, un sitio de corte de un enzima de restricción o marcador de RFLP).

Nucleótido: Molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo de tipo fosfato. Los nucleótidos son los componentes elementales de los ácidos nucleicos.

Oligonucleótido: Segmento corto de ADN sintetizado artificialmente.

Par de bases: Las dos bases de nucleótidos que están situadas en diferente cadena de una molécula de ácido nucleico y que se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno. Las bases pueden emparejarse de dos maneras: adenina con timina (en el ADN) o con uracilo (en el ARN), y guanina con citosina (en ADN y ARN).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Método para amplificar una secuencia de ADN en grandes cantidades mediante una polimerasa estable al calor y con cebadores apropiados, los cuales dirigen la amplificación de la región del ADN que interesa.

Pozol: Del nahuatl *pozolli*, es una bebida densa, a base de cacao y maíz de origen mesoamericano que sigue siendo consumida y muy popular al sur de México.

Svedberg: es una unidad para medir el coeficiente de sedimentación de una partícula o macromolécula cuando son centrifugados en condiciones normales.

TGGE: Electroforesis en geles de gradiente de temperatura. Método para separar fragmentos de ADN según su movilidad en condiciones desnaturalizantes gradualmente más calientes.

Resumen

Para conocer las especies asociadas a productos probióticos comerciales, se realizaron análisis de electroforesis desnaturalizante (DGGE) a partir de fragmentos 16S rDNA. Para esto, se emplearon dos productos probióticos, de interés comercial para acuicultura, los que fueron activados y mediante técnicas moleculares se realizaron análisis que permitieran detectar las especies que se hallan en las muestras estudiadas.

El análisis genético de los productos estudiados reveló mediante DGGE la presencia de 4 bandas muy bien definidas del producto A, y otras 2 de menor intensidad. En tanto en el producto B se observaron un total 7 bandas. Las bandas con intensidad mayor se cortaron de los geles para posteriores purificación, clonaje, secuenciación y análisis, ensayando dos métodos, uno donde se cortaron los fragmentos y otro donde se tomaron muestras con ayuda de tips descartables. En total se obtuvieron 61 clones (36 Producto A y 25 del producto B), de los cuales se seleccionaron 10 para cada producto para su posterior secuenciación.

Los resultados de la secuenciación fueron alineados con secuencias existentes en el gen Bank, identificando 4 clones del producto B que representan los géneros: *Lactobacillus sp., Bacillus sp., Acetobacter sp.y Saccharomyces sp*. La aplicación de la técnica DGGE en el análisis de los productos probióticos, fue una manera rápida de obtener perfiles que representan la diversidad de especies, demostrando que la información declarada en la etiquetas de los productos probióticos no son confiables debido a que no se detectaron especies registradas en estos productos.

1. INTRODUCCIÓN

Un factor limitante para el desarrollo de la producción acuícola es la aparición de enfermedades infecciosas como resultado de incidencia de bacterias, hongos y virus frecuentemente asociadas con el aumento en las densidades de cultivo, el rápido desarrollo de la acuicultura con deficiencias en los métodos de manejo calidad de aguas, valor nutricional del alimento entre otros factores, (Pillard *et al., 2004;* Pruzzo *et al., 2005*. En el pasado, ante la aparición de cualquier síntoma de enfermedades, se recurrió a un mal manejo de los productos antibióticos para controlar los microorganismos patógenos, cuyo espectro de acción es obviamente limitado para la prevención y control de enfermedades (Subasinghe, 1997) y además causan efectos adversos como la aparición de resistencia bacteriana, que incluso pueden llegar a afectar la salud del consumidor (Tsoumas *et al,. 1989;* Smith *et al,. 1994)*. De igual manera debido al largo tiempo de vida media en el agua de algunos antibióticos como la oxitetraciclina los residuos de antibióticos pueden llegar a modificar comunidades bacterianas de los ecosistemas próximos. De acuerdo con estos indicios las personas dedicadas a cultivos de organismos acuáticos deben evitar la aplicación innecesaria de antibiótico y dar paso al uso de probióticos como alternativa para la prevención de enfermedades. La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, FAO (Subasinghe, 1997) para mejorar la calidad del medio acuático definió el desarrollo de vacunas efectivas, el uso de inmunoestimulantes y de probióticos, como principales áreas de investigación en la lucha contra las enfermedades en acuicultura.

La demanda de productos probióticos ha producido una gran oferta en el mercado acuícola, cada producto presenta sus propias características y composición lo que guía a los consumidores a elegir alguno de ellos en base a la información difundida por el vendedor o características presentadas, en las etiquetas del producto.

Hasta hace algunos años, para conocer la composición bacteriana de un producto se dependía completamente de metodologías de cultivos dependientes que son poco sensibles, laboriosas y demandan mucho tiempo de trabajo de laboratorio. Actualmente el uso de herramientas moleculares como el DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) siendo esta técnica más utilizada ya que trabaja directamente con el DNA total extraído de los productos permitiendo realizar un análisis de manera mucho más rápida, y confiable (Temmerman, 2003, Traian*et al*. 2008).

La aplicación de electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante, como el DGGE y TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura) permiten separar fragmentos de una misma longitud (bp) pero de diferentes secuencias, que son las características de los nucleótidos obtenidos mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales del DNA de una comunidad microbiana (Díaz, 2003). El DGGE permite de esta manera una detección de cambios de hasta una sola base en fragmentos de DNA amplificados.

El presente estudio tiene como finalidad analizar la composición de dos productos probióticos comerciales muy utilizados en el sector acuícola mediante una metodología de cultivo independiente (DGGE), esta información será contrastada finalmente con la identidad y número de especies presentadas en las etiquetas de los productos analizados.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la composición de productos probióticos utilizados en larvicultura mediante electroforesis con gradiente desnaturante (DGGE) para identificar las bacterias presentes en los dos productos probióticos y contrastar los resultados con la composición presentada en la etiquetas.

Objetivos Específicos.

- Amplificar una región del gen 16s rDNA utilizando primer universales para la identificación molecular de las bacterias.
- Identificar los dos probióticos estudiados, mediante la técnica molecular DGGE (Electroforesis De Geles De Gradiente Desnaturante) para reconocer las especies que se encuentran en los productos.
- Evaluar las especies bacterianas identificadas mediante la similitud de secuencias y contrastar los resultados con la información presentada en la etiquetas respecto a la composición de los productos investigados.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de la técnica molecular DGGE (Electroforesis De Geles De Gradiente Desnaturante) permitirá la identificación de composición de las especies bacterianas que conforman los dos productos probióticos comerciales estudiados.

4. ANTECEDENTES

4.1 USO DE ANTIBIÓTICOS Y SUS APLICACIONES EN LA INDUSTRIA CAMARONERA.

Los antibióticos en acuicultura han sido utilizados por sus efectos como promotores de crecimiento y para controlar el número y frecuencia enfermedades en los cultivos (Baptista, 1998; Alderman y Hastings, 1998).

La falta de control sobre la actividad acuícola y sus residuos químicos en las naciones subdesarrolladas así como las nuevas tendencias mundiales sobre la seguridad alimentaria, han generado que los países importadores de sus productos establezcan nuevos requerimientos (Montoya y Reyes, 2003) en los límites máximos de residuos por EUA y CEE para los alimentos que ingresan en sus fronteras , se han constituido en un instrumento para asegurar la inocuidad de los productos provenientes de naciones donde las regularizaciones son irrespetadas.

Gainza, 2009 observó que las máximas concentraciones tisulares de enrofloxacina se obtienen a las dos horas del inicio de un tratamiento y este se observa durante todo el período de tratamiento, por encima de la concentración mínima inhibitoria reportada para los géneros *Vibrio* y *Rickettsia.*

En Ecuador los antibióticos no deben ser usados preventivamente, y los que se pueden usar deben de estar autorizados por el INP (Instituto Nacional de Pesca),

deben rotar periódicamente los antibióticos utilizados para no crear resistencia bacteriana (Gainza, 2009).

4.2 LOS PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN.

4.2.1 Definición de probióticos

El término probiótico deriva de "bios", que en griego significa "vida". La utilización de los probióticos nace con los trabajos de Metchnikoff (1907) quien sostenía que mediante la ingestión de microorganismos benéficos era posible controlar microorganismos patógenos. Varias definiciones de probióticos se ha propuesto, pero en todos, el término probiótico es generalmente usado para denotar bacterias que promueven el bienestar de los organismos. Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la FAO definen a los probióticos como microorganismos vivos que consumidos en cantidades adecuadas confieren efectos beneficiosos para el huésped **(**FAO/WHO, 2OO1)**.** Sanz 2003, define a los probióticos como productos que contienen microorganismos viables en cantidad suficiente para modificar la microflora de un huésped, ejerciendo un efecto beneficioso sobre la salud.

Muchos investigadores han estudiado la relación de la microbiota intestinal con el hábitat del alimento acuático. Cahill 1990, resumió los resultados de estas investigaciones en peces, mostrando que las bacterias presentes en el ambiente acuático influyen sobre la composición de la microbiota de los intestinos y

viceversa. Los géneros presentes en la zona intestinal se parecen generalmente a los que están en el ambiente de cultivo donde pueden sobrevivir y multiplicarse.

En acuicultura, se define a los probióticos como suplemento microbiano vivo que permanece vivo dentro del hospedero con el propósito de mejorar la salud (Gatesoupe, 1999) y tener la capacidad de mejorar la calidad del agua y de sedimentos. (Doulliet, 1998; Gómez, 1998).

Verschuere (2000), define el término probiótico como un conjunto microbiano vivo que tiene efecto beneficioso en el huésped modificando el ambiente de las comunidades bacterianas asegurando una mejor alimentación, mejorando la respuesta del huésped hacia las enfermedades o mejorando la calidad de su ambiente.

De acuerdo con todas estas definiciones, se puede concluir que los probióticos:

- Evitan que los patógenos proliferen en el tracto intestinal, en estructuras superficiales y en el ambiente de las especies cultivadas.
- Aseguran un uso óptimo del alimento ayudando a la digestión
- Mejoran la calidad del agua
- Estimulan el sistema inmune del huésped.

Las interacciones huésped microbio son a menudo diferentes cualitativa y cuantitativamente entre las especies acuáticas y terrestres. En el ambiente acuático, el huésped y los microorganismos comparten el ecosistema. Las

bacterias en un ambiente acuático tienen la opción de vivir en la asociación con el huésped potencial (tracto intestinal, branquias, o piel), mientras que en el ambiente terrestre, la actividad se puede limitar a lugares tales como los proporcionados por los intestinos de los animales del huésped.

Los animales acuáticos están rodeados por un ambiente que mantiene bacterias patógenas independientemente de los presentes en el huésped, así los patógenos (oportunistas) pueden alcanzar altas densidades alrededor del animal (Moriarty, 1998). Las bacterias circundantes ingresan continuamente con la alimentación o cuando el huésped está filtrando. Éste es especialmente el caso de los organismos filtradores que ingieren altas cantidades de bacterias, causando una interacción natural entre la microbiota del ambiente y el alimento vivo.

Los primeros estudios de los probióticos en acuacultura se realizaron en juveniles de peces, recientemente hay atención a las larvas de peces, crustáceos y a los organismos que constituyen el alimento vivo.

Los animales terrestres (mamíferos) heredan una parte importante de las bacterias inicialmente por colonización a través de contacto con la madre, mientras que las especies acuáticas generalmente desovan en el agua huevos axénicos, sin contacto adicional con los padres. Esto permite que las bacterias ambientales colonicen la superficie del huevo. Además, las larvas recientemente eclosionadas no tienen un sistema intestinal completamente desarrollado y no tienen ninguna comunidad microbiana en el tracto intestinal, en las branquias, o en la piel. Debido a que la

diversidad microbiana de los primeros estadíos de las larvas acuáticas dependen de la microbiota primaria del agua en la cual se crían (Cahill 1990; Hagiwara 1994; Ringo 1999), las propiedades de las bacterias presentes en el ambiente son de importancia extrema (Skjermo 1997).

Por otra parte las bacterias Gram negativas son dominantes en el tracto gastrointestinal de peces y mariscos por lo cual los géneros comúnmente encontrados en estos medios de cultivos como *Vibrios* y *Pseudomonas* también han sido evaluadas como probióticos, por ejemplo el *V, alginolyticus* incrementan el factor de conversión y mejora la supervivencia en infecciones por baño con *V. parahaemolyticus* (Balcázar *et al.,2007c*), así como las *Pseudomonas* mejoran el sistema inmune del camarón pero no es consistente de enzimas extracelulares *in vitro* (Alavandi *et al.,* 2004)

4.2.2 Mecanismos De Acción De Los Probióticos

Los mecanismos de acción de las bacterias constituyen un factor determinante de la composición de la microflora intestinal y medioambiental de las especies acuáticas del cultivo (Balcázar, 2002).

- Compiten por sitios de adhesión, nutriente y energía disponible con bacterias patógenas
- Mejoran la nutrición con el suministro de nutrientes esenciales.
- Incrementan la digestión con el suministro de enzimas esenciales.

- Eliminan directamente la materia orgánica disuelta.
- Producen sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas.

Exclusión competitiva

El antagonismo bacteriano es un fenómeno natural, en donde las interacciones microbianas juegan un rol importante de equilibrio entre la competición benéfica y microorganismos potencialmente patógeno. La composición de las comunidades microbianas pueden ser alteradas por prácticas agrarias y condiciones ambientales que estimulan la proliferación de algunas especies de bacterias.

Se conoce que la microbiota en el tracto gastrointestinal de animales acuáticos puede ser modificada, la manipulación microbiana constituyen una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de patógenos oportunistas (Balcázar, 2002).

Mejoramiento de la nutrición por suministros de nutrientes esenciales

Algunas investigaciones revelan que los microorganismos poseen efectos beneficiosos para el proceso digestivo de animales acuáticos. Sakata (1990), reportó en peces que los géneros *Bacteroides* y C*lostridium* sp. contribuían a la nutrición del huésped especialmente por el suministro de ácidos grasos y vitaminas.

Algunas bacterias participan en los procesos digestivos de bivalvos produciendo enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, que son factores necesarios para el crecimiento. (Prieur *et al*., 1990).

Mejora en la calidad del agua

La calidad del agua puede ser mejorada con la adición de probióticos, en especial del género *Bacillus* sp. La explicación se basa en que las bacterias Gram positivas son las mejores convertidoras de materia orgánica. Durante los ciclos de producción los niveles altos de bacterias Gram positivas pueden minimizar la acumulación de partículas disueltas y carbono orgánico, promoviendo al mismo tiempo bloom de fitoplancton más estables a través del aumento de la producción de CO_2 (Dalmin *et al*., 2001).

Laloo *et al*. (2007) comprobó que tres aislados de *Bacillus* tienen la capacidad de disminuir las concentraciones de Nitritos, nitratos, y amonio en el agua de cultivos de peces ornamentales. Kim *et al.* (2005), observo ese fenómeno en *B. subtillus, B. cereus, B. licheniformis,* atribuye este efecto a mecanismos de bioacumulación, bioasimilación y nitrificación,

Sin embargo, varios estudios han utilizado una o más géneros bacterianos como *Bacillus, Nitrobacter, Pseudomonas, Enterobacter, y Rhodopseudomonas* spp. en cultivos de camarones (Lin., 1995; Reid, 1993) y del bagre de canal, pero no

pudieron confirmar esta hipótesis. Esto demuestra que las evidencias para la mejora de la calidad del agua es deficiente, salvo en lo relativo a la nitrificación.

Además de esto se ha reportado que el empleo de *Bacillus* sp. mejora la calidad del agua, la supervivencia e índices de crecimiento, de los juveniles *Penaeus monodon* y reduce la aparición del patógeno (Verschure, 2000).

Cabe mencionar que la calidad de agua en los cultivos intensivos no solo está determinada por la composición de comunidades bacterianas sino también por parámetros fisicoquímicos del agua tales como la salinidad, la temperatura, concentración de oxigeno que pueden favorecer la entrada y proliferación de algunas bacterias (Verschuere *at al.,* 1997, 2000a; Villamil *et al*., 2003a)

Efecto antiviral

Algunas bacterias usadas como posibles probióticos tienen efectos antivirales aunque el mecanismo exacto no es conocido, las pruebas en el laboratorio indican que la inactivación del virus puede ocurrir por sustancias químicas y biológicas como extractos de algas marinas y los agentes extracelulares de la bacteria. Se ha reportado que ciertas cepas de *Pseudomonas sp., Vibrios sp., Aeromonas sp.,* y los grupos de *Corynebacteria*s aislado en criaderos de salmónidos, mostraron actividad antiviral contra el virus de necrosis infecciosa hematopoyética (IHNV) con la reducción de placa de más del 50 % (Kamei *et al*., 1988).

Mejoramiento de la respuesta inmune

El sistema inmunológico no específico puede ser estimulado por probióticos. Ha sido demostrado que la administración oral de la bacteria *Clostridium butyricum* a la trucha arco iris mejoró la resistencia a vibriosis, aumentando la actividad fagocitaria de leucocitos (Sakai et al., 1995). Balcázar (2003), demostró que la administración de una mezcla de cepas bacterianas (*Bacillus* y *Vibrio* sp.) influyó positivamente en el crecimiento y la supervivencia de juveniles del camarón blanco y presentó un efecto protector contra el patógeno *Vibrioharveyi* y el virus de síndrome de mancha blanca. Chiu *et al.* (2007) informaron que es posible eliminar el *Vibrio alginolitycus* en infecciones experimentales a camarón blanco *L. Vannamei,* debido al aumento significativo de la actividad fenoloxidasa (PO), el estallido respiratorio y la superoxido dismutasa (SOD), así como al transcripción del mRNA peroxinectina (PE), pronfenoxidasa (proPO), que produce el complemento alimenticio *Lactobacillus plantarum.*

Litopenaeus vannamei posee enzimas digestivas (α amilasa, tripsina) que pueden ser activadas por acción de ciertos probióticos o sus productos extracelulares. Sotomayor *et, al* (2009) determinaron que los productos extracelulares liberados de la cepa probiótica P62 (*Vibrio*) estimula la actividad enzimática de la amilasa pero aplicando probióticos completos, estimularon la actividad enzimática de la amilasa y la tripsina. Estos resultados confirman lo reportado por Cecile (2006) en *Artemia franciscana* expuesta a ECPs (Productos extracelulares) del probiótico

PSA, que ciertas bacterias liberan moléculas con capacidad de estimular la actividad enzimática de crustáceos.

4.3 EL RIBOSOMA BACTERIANO COMO ELEMENTO DE ESTUDIO PARA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

4.3.1 Los Ribosomas y el 16S rDNA

Los ribosomas fueron observados por primera vez por Albert Claude a finales de los años 30. Sin embargo, a mediado de los años 50 George Palade los observó mediante microscopia electrónica. En 1995, Paul Zamecnick demostró que son el sitio de síntesis de proteína.

El ribosoma bacteriano (fig. 1) tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S).

Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteíco constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S procede de small), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5Sy 23S junto con unas 34 proteínas (L1-L34; L, large) (Rodicio *et al* 2004).

Debido a que los ribosomas son críticos para la función celular e interaccionan con un gran número de moléculas de rRNA incluyendo el ARN mensajero

(mRNA) y el RNA de transferencia (tRNA) las secuencias de las moléculas de rRNA están altamente conservadas y se han mantenido notablemente a través de la evolución (Rodicio *et al* 2004)

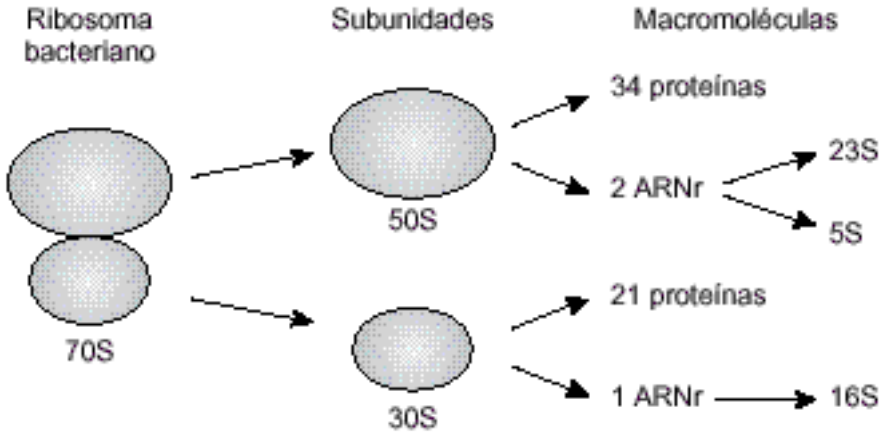


Figura # 1. El ribosoma bacteriano, las subunidades y macromoléculas que lo componen.

4.3.2 ARNr 16S

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nt, codificado por el operón ribosómico (rrs), también denominado ADN ribosoma 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, (Neefs, 1990) el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (fig. 2). En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente.

Dado que los ARNr 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, small subunit) se utiliza para ambos. Los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas (fig. 2). Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótios pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Neefs, 1990).

El número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15, siendo relativamente constante a nivel de especie, género e incluso familia. Entre las copias de los ARNr 16S codificadas por un mismo genoma se ha detectado un cierto grado de heterogeneidad (Rodicio *et al* 2004).

En general las bacterias no poseen núcleo organizado pero este puede replicarse dando lugar a copias idénticas y transcribirse a RNA. La información codificada en forma de RNA puede a su vez ser traducida a una secuencia de aminoácidos que forman una proteína (Rodicio *et al* 2004).

Las bacterias poseen una enorme capacidad de adaptación al ambiente, reflejo de su gran variabilidad genética. Esto es debido, a que el DNA puede cambiar o mutar. Algunas mutaciones pueden ser letales para la bacteria, y otras pueden

proporcionarle nuevas características y posibilidades de supervivencia en los distintos ambientes.

Otra forma de aumentar la variabilidad genética es el intercambio o la transferencia de DNA entre bacterias. Se conocen tres sistemas de intercambio genético: la transformación, la conjugación mediada por plásmidos y la transducción mediada por fagos (Díaz, 1999).

Cada especie viva posee en su estructura celular la información necesaria para transmitir a sus descendientes caracteres especiales, que se conocen como hereditarios, o sea, que se heredan de los progenitores (Díez, 2001).

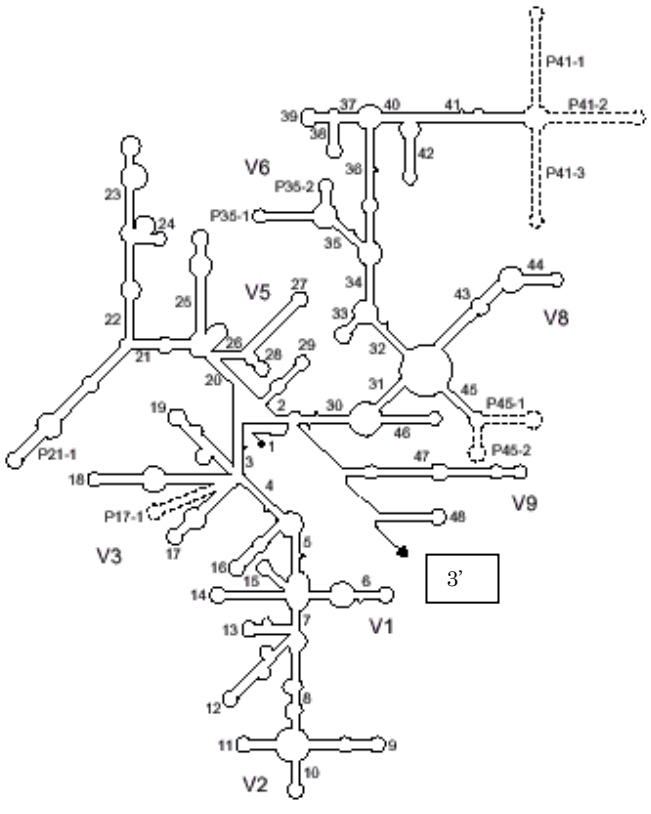


Figura # 2. Estructura secundaria del ARNr 16S (tomada de Rodicio,2004).

4.3.3 Características relevantes Del ARNr 16S para su utilización como herramienta filogenética y taxonómica

Esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese (1987) como cronómetro molecular:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16 (1.500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

4.3.4 Aplicaciones de la secuenciación del ARNr 16S en el diagnóstico microbiológico

La identificación basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S se centra principalmente en cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, incluyendo los siguientes casos (Rodicio, 2004):

1. Bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas, hecho que en ocasiones ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos.
2. Bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida. Esta situación puede presentarse cuando se trata de patógenos nuevos, patógenos infrecuentes o también cepas de especies comunes que exhiben un perfil bioquímico ambiguo.
3. Bacterias para las cuales la caracterización fenotípica sea sustancialmente deficiente.
4. Bacterias de crecimiento lento, que retrasa considerablemente la identificación convencional.

La identificación de organismos de cualquier tipo de muestra se realizan utilizando diversos tipos de métodos moleculares entre los que se encuentran: la Reacción de cadena de polimerasa (PCR), EL PCR de Tiempo Real (RT PCR), La hibridación In-Situ Fluorescente (FISH) y la Secuenciación, estos métodos están dirigidos a caracterizar e identificar las regiones especificas de de los ácidos

nucleicos especialmente del 16S rDNA. Este tipo de métodos alternativos se caracterizan por ser precisos y rápidos.

En los últimos años ha existido un gran interés por desarrollar protocolos de PCR específicos para detectar bacterias patógenas de peces, que pudiesen ser usados como herramienta de diagnóstico en la detección de enfermedades. Comparada con el cultivo celular para la detección de patógenos intracelulares obligados, el tiempo que se requiere para el ensayo puede ser reducido de días/semanas a horas. Por otra parte, los costos del PCR son menores a los de la técnica de cultivo celular y con respecto a los tiempos de entrega del diagnóstico también.

La técnica PCR ha permitido documentar rápidamente los brotes de *piscirickettsiosis* que han ocurrido en el sur de Chile, tanto en peces altamente infectados y con signos clínicos de la enfermedad, como también en aquellos asintomáticos (Marshall et al., 1998). Los catastros realizados para la búsqueda de nuevas variantes de *P. salmonis* en la región del ITS, en diferentes épocas del año y localidades geográficas, han permitido detectar que en Chile los brotes de *piscirickettsiosis* han sido producidos por una sola cepa tipo prevalente, aquella conocida como LF-89 (Heath et al., 2000).

Braun indicó que la técnica FISH era útil para diferentes tipos celulares, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram negativas y concluyó que esta

metodología era aplicable a muestras ambientales, las cuales comprenden diversos tipos celulares en diferentes estadios.

4.3.5 Los plásmidos y su importancia en los estudios moleculares

Son pequeñas moléculas de ADN circular de 1 kb a 200 kb que se pueden encontrar en las bacterias. Los plásmidos se replican y se transmiten independientemente del cromosoma bacteriano. La replicación y la transcripción de los plásmidos dependen de las proteínas de su hospedero. Los genes codificados por los plásmidos le donan ciertos privilegios a la célula huésped. (Fig 3)

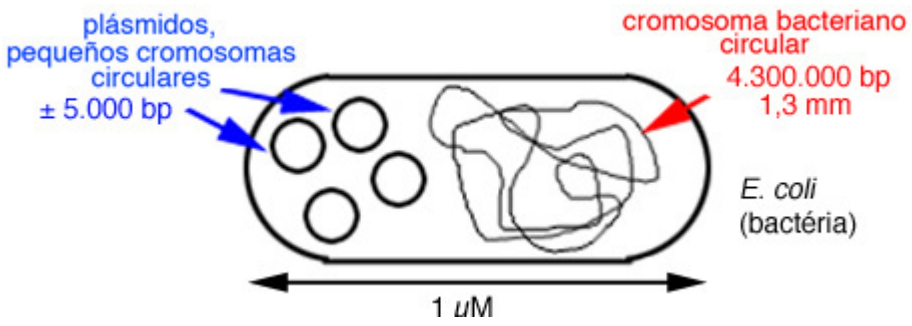


Figura # 3. Estructura bacteriana presenta cromosoma bacteriano y DNA extracromosómico o plásmido.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y generalmente de pequeño tamaño que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del DNA cromosómico. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos, a metales etc.

Los plásmidos poseen un interés singular en Ingeniería Genética por ser uno de los sistemas vectores más sencillos de usar. Un vector de clonación es un sistema que permite introducir en una célula hospedadora un fragmento de DNA que se pretende clonar; en esta célula hospedadora el vector se replica y expresa, en su caso. La molécula que resulta de la unión de un DNA vector con el DNA de interés (denominado entonces "inserto") se denomina molécula de vector recombinante (Cejudo *et. al* 2008).

Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido ideal debe poseer al menos tres características: 1) Debe tener su propio origen de replicación y por tanto la capacidad de replicación autónoma independiente del genoma del hospedador. 2) Debe tener sitios de clonación múltiple que permitan la apertura del DNA con enzimas de restricción y hace posible la clonación de insertos de DNA en la forma y orientación determinada. 3) Debe poseer marcadores genéticos seleccionables que permitan aislar las células hospedadores que contengan el vector. La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que una primera tarea de la Ingeniería Genética ha consistido en la construcción de plásmidos artificiales, combinando en una misma molécula diversos rasgos útiles procedentes de los plásmidos naturales (Cejudo *et. al* 2008).

Los plásmidos se utilizaran porque son empleados como vectores o vehículos de clonación de moléculas de ADN debido a las propiedades que posee por su

pequeño tamaño que hace que el ADN sea fácil de aislar y manipular, su naturaleza circular que hace que el ADN sea más estable durante la extracción, su origen de replicación independientemente del control directo de la replicación del cromosoma bacteriano, su múltiples número de copias de manera que se aumenta la eficiencia de la extracción de ADN plasmídico, la presencia de de marcadores seleccionables, tales como genes de resistencia antibióticos , haciendo así más fácil la detección y selección de las bacterias que contienen plásmidos.

4.4 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE LA SECUENCIA 16S RDNA A PARTIR DE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

4.4.1 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Esta técnica amplifica fragmentos específicos de ADN a partir de cantidades mínimas del ADN patrón (Erlich 1989). Es una técnica que sirve para la amplificación *invitro* de secuencias de ADN especificas, La amplificación se logra mediante la extensión de los cebadores que son complementarios a secuencias los extremos 3`del segmento bicatenario que se pretende amplificar. Gracias a la taq polimerasas (*Thermus aquaticus*) permitió perfeccionar la técnica ya que esta enzima puede resistir altas temperaturas como las necesarias para la desnaturalización del ADN (95ºC) y adicionalmente permite manejar temperaturas de hibridación y extensión que dejan margen para manejar la astringencia de la reacción y así amplificar únicamente las secuencias de ADN especificas.

La ADN polimerasa hace la síntesis de una hebra complementaria de ADN en dirección 5`→3`usando un molde de cadena sencilla, pero comenzando en una región de doble cadena (Concepción J.). La PCR usa el mismo principio pero emplea dos cebadores cada uno complementario a la hebra opuesta de la región de ADN, la cual ha sido desnaturada por calentamiento.

4.4.2 Técnicas moleculares como herramientas para la caracterización de productos comerciales.

Las técnicas moleculares permiten, sondear la complejidad y variabilidad del contenido genético de los organismos. Estas técnicas nos permiten obtener una valiosa herramienta a la hora de identificar no solo una especie, si no diferentes variedades y cepas de microorganismos existentes en el medio o en productos de interés.

En general todas estas herramientas se basan en estudios a nivel de DNA y su amplificación por medio de la técnica PCR.

4.4.3 Aplicación de la técnica El DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) en identificación bacteriana.

Fundamento de la técnica DGGE

La electroforesis de gradiente desnaturante (DGGE) es una técnica que forma parte de un grupo heterogéneo de técnicas moleculares conocidas como métodos de rastreo molecular, que se desarrolló para detectar mutaciones puntuales en las secuencias del DNA (Kirk, 2004), y que de otra formas analíticas, serían muy

costosas de diferenciar, comúnmente es usada en biología molecular y se ha convertido en un elemento básico de la ecología microbiana para la caracterización de estructuras y dinámicas de poblaciones. Este método es una herramienta que puede rápidamente proveer caracterizaciones tangibles de composición de diversas comunidades y los cambios en la población pueden ser demostradas fácilmente.

El DGGE se basa en el análisis de la información genética de las bacterias sin cultivar (Rombaut, 2001), se emplea para la separación de los fragmentos de DNA (extraído de las muestras) de doble cadena de longitudes idénticas, pero con diferentes secuencias (Díaz 2003). Esta separación de los fragmentos de DNA es producido por la amplificación de PCR con iniciadores específicos para el 16S rDNA bacteriano (Cytryn, 2003; Fantroussi, 1999). La técnica se da por la diferencia en la estabilidad de apareamiento de G-C (3 enlaces del hidrógeno por apareamiento) en comparación con el apareamiento A-T (2 enlaces del hidrógeno). Una mezcla de los fragmentos de DNA de diversa secuencia es electroforisado en un gel de acrilamida que contiene concentraciones crecientes de agentes desnaturalizantes (usualmente úrea y formamida) (Schwieger, 1998; Fischer 1979). En general, los fragmentos de la DNA más ricos en C-G serán más estables y seguirán siendo doble cadena hasta alcanzar concentraciones más altas del desnaturalizante. Los fragmentos de doble cadena de DNA migran mejor en el gel de acrilamida, mientras que las moléculas desnaturalizadas del DNA se convierten en cadenas simples (Stefan,S.J. 2005).

Esta electroforesis de los productos amplificados permite separar los fragmentos de DNA de un mismo tamaño en base a su punto de fusión el cual es dependiente de la secuencia de los fragmentos (Ercolini, 2003; Ranjard, 2000). Permitiendo definir aproximadamente la cantidad de fragmentos de ADN del mismo tamaño que tienen secuencias con diferente contenido de GC. Tiene una ventaja que supera a los demás métodos, pues permite la identificación de organismos específicos representados en una "impresión digital" por extracción y secuenciación del DNA desde las bandas en el gel (Crump, 2003).

Las "impresiones digitales" han sido usadas para estudiar las comunidades bacterianas complejas y para estimar la diversidad y representación relativa de unidades taxonómicas de bacterias individuales dentro del total de las comunidades bacterianas detectadas (Hewson, 2004).

Por investigaciones realizadas tanto en cultivos acuícolas, alimentos y otros, se determino que esta herramienta es útil que confirman la presencia de bacterias, además se basa en análisis de la información genética de las bacterias sin cultivar, y tiene la ventaja de detectar diferencias entre los fragmentos, si bien cada una de las bandas totales que se detectan representa una especie bacteriana, que pueden clarificar presencia de bacterias en los productos probióticos comerciales evitando la utilización de métodos que incluyan el cultivo bacteriano por medio de técnicas tradicionales.

Aplicaciones del DGGE en la caracterización de comunidades bacterianas

En Cultivos Acuícolas

El estudio y conocimiento de la diversidad y la ecología bacteriana de los cultivos es de suma importancia para la Acuicultura en general, debido a que pueden ayudar a la prevención y diagnóstico y control de enfermedades. El conocimiento de los agentes causales que provocan las enfermedades en los cultivos permite tomar las medidas adecuadas, presentándose así la posibilidad de disminuir o evitar pérdidas de mortalidad (Mialhe *et al*1995).

El DGGE posee muchas aplicaciones, ha sido empleado para estudiar, la diversidad bacteriana en dos diferentes sistemas de cultivos de rotíferos (tradicional versus recirculación). Los perfiles genéticos en DGGE de los sistemas tradicionales presentaron variaciones diarias para cada día de cultivo, a diferencia del sistema de recirculación la microbiota muestra un comportamiento estable permitiendo diferenciar tres períodos, cada uno corresponde un período típico durante la producción de rotíferos durante el ciclo de cultivo (Rombaut, 2001).

Se ha utilizado la técnica de DGGE para detectar bacterias patógenas en peces, Ji et al (2004) demostró que el DGGE puede detectar rápidamente múltiples bacterias en una sola muestra, sean estas de cultivo axénico o mezclas de comunidades. En un cultivo de camarón *Penaeus vannamei* Borbor, 2005 realizó un estudio Comunidades Bacterianas generando índices de diversidad a partir de

DGGE en sistemas de engorde de camarón, este análisis reveló la composición de las comunidades microbianas fueron superiores en muestras de agua con respecto al sedimento de las piscinas de cultivo y reflejó el efecto de las condiciones ambientales sobre la diversidad de comunidades bacterianas probablemente por el hecho de que ciertos sistemas de cultivos son menos controlados por lo tanto más susceptibles de variaciones.

Se realizaron análisis de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) a partir de fragmentos del 16S rADN en muestras de sedimentos en cuatro sectores dentro de la bahía, durante tres períodos de muestreo y cuatro profundidades. El análisis genético de las comunidades procarióticas estudiadas reveló una alta diversidad bacteriana, la cual se estableció por el gran número de bandas detectadas por DGGE. Se encontraron además, diferencias en la estructura de comunidades procarióticas asociadas a las distintas profundidades analizadas. (Araya et al 2008).

En Alimentos

Existen varios trabajos que demuestran que DGGE es una herramienta confiable para establecer desarrollo de comunidades bacterianas en alimentos, Temmerman (2003), utilizó la técnica para analizar e identificar bacterias en los productos probióticos para consumo humano, hallando que la técnica era fácil, confiable y reproducible para analizar, detectar e identificar potencialmente este tipo de

productos a diferencia de los métodos de cultivos dependientes que demandan más tiempo y son poco confiables.

La primera aplicación de DGGE en análisis microbiológicos para alimentos fue presentado en 1999, cuando Ampe et al. publicó trabajos en el que se halla la distribución espacial de microorganismos en la bebida mexicana pozol. La bacteria ácida láctica fue identificada mediante secuenciación de fragmentos de DNA purificados, mediante perfiles obtenidos en DGGE después de la extracción directa de DNA en el pozol y una amplificación de la región variable V3 de la 16S rDNA. Combinando los resultados de los análisis de los perfiles de DGGE con sondas de hibridación 16S rDNA se pudieron detectar organismos que se encuentran en los productos de fermentación. Ampe et al (1999). Comparando el análisis de la flora bacteriana por DGGE y los resultados de los análisis de microbiología tradicional, este autor concluye que los métodos de cultivos independientes parecen ser superior a los estudios tradicionales de fermentación de alimentos. Los autores identificaron que las especies microbianas dominantes que aparecían en estos productos analizados dependían mucho de los pasos realizados durante el proceso de fermentación.

Para Cocolin *et al.* (2001) la técnica fue provechosa para monitorear cambios dinámicos en la comunidad bacteriana durante los procesos de fermentación de las salchichas italianas, mediante el DNA y RNA extraído directamente del producto. Para las amplificaciones (análisis de PCR) se utilizó la región V1 de 16S rDNA,

para luego ser separadas por DGGE. Las bacterias ácido lácticas se encuentran en la primera etapa de la fermentación de este producto, principalmente organismos de la familia *Micrococcacea* y organismos contaminantes como *Brochothrix thermosphacta* y *Enterococcus* spp. La bacteria ácido láctica predominó en especial *Lactobacillus sake* y *L. curvatus*, estas son responsables de la acidificación y de las características organolépticas de los embutidos mientras que las *Micrococcacea* poseen un ambiente restringido frente a las acido lácticas.

Röling *et al*., (2001) estudió las comunidades microbianas que se presentan en los curados de vainilla en Indonesia, reportando una importante presencia de *Bacillus* destacando también la presencia de organismos no cultivables a altas temperaturas durante la fase de curación.

Las bebidas también se benefician con este tipo de investigación sean estas fermentadas o no fermentadas. Van Beek y Priest (2002), estudiaron las comunidades bacterianas del Whisky, mediante PCR-DGGE de la región V3 y PCR-DGGE de las regiones V6 –V8 optimizaron con esta técnica la separación de *Lactobacillus* en DGGE mediante la adopción de las regiones V6-V8 del 16S rDNA.

Ogier (2004), realizó un análisis en el ecosistema microbiano de los productos lácteos aplicando dos métodos sistemáticos rápidos basados en perfiles genéticos, estos son DGGE (Electroforesis de gradiente desnaturalizante) y TTGE

(Electroforesis de gradiente desnaturalizante). Ambos análisis revelaron que en la superficie y en el interior de muestras de quesos existen diferencias de ecosistemas bacterianos. Con este estudio se reveló que existen mayores contenidos G + C en la superficie del queso que en el interior de este, que representan a varias especies. EL DGGE demostró ser una herramienta útil y rápida para identificar especies bacterianas de amplio rango, dentro de los productos lácteos. Fontana (2005), implementó esta herramienta para establecer el desarrollo de la microbiota de productos de embutidos fermentados. El análisis de PCR-DGGE con amplificaciones de 16S rDNA permitió diferenciar entre LAB (bacterias ácidas lácticas) y bacterias Gram positivas de estos productos fermentados.

De la misma forma Randazo et al. (2002) examinó la sucesión de los microorganismos durante la producción artesanal del queso Siciliano. Para la identificación de la microflora total se utilizó la región V6- V8 de 16S rDNA mientras que los iniciadores específicos para *Lactobacillus* se usaron para la región V1-V3. El análisis de la microflora también se realizó por trascripción inversa seguido por DGGE. Los perfiles de DGGE en el análisis de las muestras durante la producción del queso muestran los cambios en la estructura de las comunidades microbiana. La clonación y secuenciación del DNA revelaron que las bacteria dominantes fueron la mesofílicas incluidas *Leuconostocs, L. lactis Macrococcus caseolyticus* que eran dominantes en la leche cruda, mientras que *S. thermophilus* prevaleció durante la fermentación. Otras formas de LAB fueron

halladas especialmente *L. delbrueckii*, estas fueron obtenidas durante la fase de maduración del queso.

Otras Aplicaciones

La técnica de DGGE permite identificar, directamente la presencia y abundancia relativa de especies diferentes no cultivadas y dar un perfil cualitativo y semicuantitativo de las poblaciones microbianas Muyzer (1993). Kawai et al (2002), utilizó la técnica para examinar e identificar la comunidad bacteriana presente en el agua purificada para los procesos de fabricación farmacéutica, encontrando que la diversidad bacteriana es significativamente baja en comparación con otros ambientes, esta técnica puede ser una importante herramienta de control que permite evitar problemas y tomar acciones correctivas.

Díez (2001), examinó la diversidad de picoeucariótes marino (Mar Mediterráneo) con DGGE usando iniciadores específicos 18S rDNA. Se optimizaron las condiciones para el iniciador probando su funcionamiento con cultivos y muestras ambientales. La eficacia de cada sistema fue evaluada comparando los perfiles obtenidos de diferentes muestras del Mar Mediterráneo. Las bandas de DGGE mas intensas obtenidas se utilizaron para comparar la diversidad picoeucariótica en las muestras obtenidas en diversas profundidades y fechas. El análisis de DGGE reveló que en las muestras superficiales del mar mediterráneo el grupo más abundante era el de prasinophytas. Las bandas que corresponden al grupo de

las prasinophytas no se encontraron en muestras de aguas profundas. Otros grupos detectados eran *primnesiphytas, cryptophytas, dinophytas, y pelagophytas*. Este método permitió la identificación filogenetica de los miembros dominantes de organismos picoeucarióticos marinos

Smith et al (2001), aplicó la técnica para analizar la diversidad bacteriana en el suelo de un campo de trigo e investigar la magnitud de los cambios estacionales sobre la comunidad bacteriana, los resultados indicaron que la comunidad presente en el mes de Julio se diferenciaba notablemente con los otros meses, las secuencias del 16S rDNA de las divisiones bacterianas indicaron que el ratio entre el número de proteobacterias y ácido bacterias puede ser un indicativo de los niveles tróficos en el suelo.

Bano and Hollibaugh (2002) la utilizaron para analizar la composición filogenética del grupo de bacterioplancton en muestras colectadas del Océano Ártico en tres estaciones (1995, 1996, 1997) encontrando que la mayoría de las bandas son comunes para todas las muestras en las tres estaciones.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Activación de probiótico

Cada producto probiótico (A, B,) se activó en TSB (Tryptic Soy Broth) al 2% de NaCl, para luego realizar la extracción de DNA total bacteriano. Tabla # 1.

Tabla # 1. Activación de productos probióticos comerciales.

PRODUCTO	g	TSB al 2% NaCl (ml)	Tiempo de activación
A	1	10	1 hora
B	1	10	1 hora

5.2.Aplicación de técnicas moleculares

5.2.1. Extracción de DNA de Probióticos

La técnica empleada para el aislamiento del DNA total fue en base a CTAB—Fenol – Cloroformo e isopropanol para la precipitación, en base al método descrito por Smalla et al., 1993 como sigue:

- Para la extracción del ácido nucleico se debe utilizar tubos estériles.
- De los productos activados (cada uno con 10 ml), tomar 400 µl del sobrenadante
- Adicionar 400 µl de tampón CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) y 10 µl de proteinasa K (Invitrogen ®) (concentración final 20 mg. ml^{-1}).
- Agitar y llevar a "baño maría" a 55°C por 1 hora (se homogeniza en cada fase para ayudar a la lisis celular).
- Se deja enfriar las muestras a temperatura ambiente.

- Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos y tomar 400 µl de sobrenadante en tubos de 1,5 ml estériles.
- Adicionar 500 µl de fenol – cloroformo, mezclar y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos, recuperar el sobrenadante en tubos nuevos.
- Agregar 400 µl de cloroformo, centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos, y recuperar el sobrenadante en tubos nuevos.
- Agregar 400 µl de Isopropanol puro, y mantener en frío por 12 horas para precipitar el DNA, y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y hacer un lavado del pellet con 100 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar a 12000 rpm por cinco minutos y eliminar el sobrenadante, se seca el pellet a 40°C por 10 minutos, y resuspender el DNA en 50 µl de agua milliQ.

5.2.2. Cuantificación de DNA

La concentración del DNA extraído se determinó por espectrofotometría, utilizando las propiedades de las base púricas y pirimidínicas de absorber los rayos ultravioletas a 260 nm. Se utilizó un equipo Bio Photometer Eppendorf, aplicando dilución 1 / 20 con agua milliQ estéril doblemente filtrada, obteniendo ratios a 280 – 230 nm.

- La concentración del DNA se estandarizó en 60 ng / µl.
- Si las concentraciones fueron mayores se realizó diluciones.

El DNA fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado en la PCR.

5.2.3. Purificación del DNA bacteriano

Debido a los altos ratios de 280/230 nm obtenidos en los producto obtenidos se realizó la purificación siguiendo el método descrito por Smith et al., 1997, y utilizando el sistema de purificación basados en filtros (Wizard PCR prep. DNA Purification system – Promega ®) que se describe a continuación:

- Adicionar 500 µl de resina a 30 µl de muestra (DNA), y agitar aproximadamente por 2 minutos.
- Tomar 1 ml de muestra y filtrar.
- Filtrar 2 ml de isopropanol al 80% para lavar el DNA, centrifugar la muestra filtrada a 12000 rpm por 2 minutos.
- Dejar las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar los filtros en tubos estériles de 1,5 ml y adicionó 50 µl de agua destilada doblemente filtrada a 68°C.
- Dejar incubar las muestras por minutos.
- Centrifugar nuevamente a 12000 rpm por 2 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en tubos nuevos.

5.2.4. Amplificación del DNA bacteriano del 16S RNA.

La reacción en PCR – 16S RNA se realizó en base al método descrito por Schaefer et al., (2001).

- Los productos de ADN extraídos fueron amplificadas por PCR – DGGE usando el iniciador PRBA338F-GC (5´-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAC

TCCTACGGGAGGCAAGCAG-3´), y el iniciador 518R–1 (5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´), complementarios a la región conservada 16sARN, con 30 ciclos térmicos.

- El volumen final de mezcla por muestra para una amplificación mediante PCR fue de 25 µl. Tabla # 2

Tabla # 2. Concentraciones de la mezcla de PCR.

REACTIVO	**CONCENTRACION INICIAL**	**CONCENTRACION FINAL**	**VOLUMEN POR MUESTRA**
Agua	-	-	14,95 µl
PCR- Tampón	10X	1X	2,5µl
Mg Cl_2	25mM	2,1Mm	2,1µl
DNTPs	10mM	0.2Mm	0,5µl
Iniciador – F	20mM	0.3mM	0,375µl
Iniciador – R	20mM	0.3mM	0,375µl
TAQ	-	-	0,2µl
DNA	-	-	4,0µl
Total			**25µl**

- La amplificación por PCR se realizo en el equipo PTC 200 MJ Research, bajo las siguientes condiciones. Tabla # 3:

Tabla # 3. Condiciones de amplificación para 16S rDNA bacteriano de las muestras de probióticos.

Fase	**Temperatura (°C)**	**Tiempo (min)**
Desnaturalización inicial	94	5: 00
Desnaturalización (a)	92	1:00
Hibridación (a)	55	1:00
Polimerización (a)	72	2:00
Polimerización final (b)	72	10:00
Conservación (c)	20	30:00

(a) Se repite 20 veces
(b) Solo en el último ciclo
(c) Al completar los 30 ciclos

5.3.Identificación de especies a partir de DGGE

Después de la extracción de ADN de los productos estudiados, es necesaria la identificación de especies que se encuentran en los probióticos comerciales a partir de DGGE, previo a esta técnica se debe seguir los siguientes protocolos:

5.3.1. Electroforesis en geles de agarosa

La integridad del DNA total se confirma por electroforesis en geles de agarosa

- Preparar un gel de agarosa al 2 % (w/v) usando una solución de buffer de electroforesis (solución TAE 1X) y bromuro de etidio (concentración final 10 mg/ml)
- Utilizar un horno de microondas para fundir la agarosa en el buffer de electroforesis.
- Una vez que el gel se polimerice se retirar el sello de la bandeja, el peine y se colocar la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis.
- Anadir suficiente buffer TAE 1X (pH8) para cubrir el gel.
- Tomar 8 µl del producto amplificado.
- Con una pipeta colocar cada muestra en un pozo, incluyendo un marcador de 1kb de peso molecular como referencia.
- Para la migración del gel del producto amplificado, se conecta la bandeja de electroforesis a una fuente de poder (CBS Scientific Company EPS 250) a 125 voltios durante 2 horas. Como el DNA posee carga negativa migra hacia el lado positivo.

- Finalmente el gel fue fotografiado con la cámara digital (Kodak Digital DC 120 Zoom, Gibco BRL UV transiluminador TFX- 35M), la fotografía digital fue registrada y visualizada utilizando el programa "kodak digital Science IQ Image Analysis Software" (versión 3.0, Macintosh).

5.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se utilizó un equipo para DGGE (CBS Scientific) siguiendo el protocolo descrito por Muyzer (1993) con algunas modificaciones.

Se emplea un gel de poliacrilamida (6%) con un gradiente químico lineal del 40 al 60 % desnaturante (El desnaturante al 100% contiene 7M úrea y 40% de formamida) con un ratio de arcrilamida y bis-acrilamida de 37,5;1, sumergido en una solución buffer TAE 1X (40Mm Tris, 40Mm de ácido acético, 1 Mm: pH 7.4)

El gel de poliacrilamida con gradiente desnaturante se preparó de la siguiente manera:

- En un tubo se mezcló 8,5 ml de desnaturante al 60% mas 59 µl de persulfato de amonio al 10% mas 3,7 µl de TEMED.
- En otro tubo se mezcló 8,5 ml de desnaturante al 40% mas 59 µl de persulfato de amonio al 10% mas 3,7 µl de TEMED.
- Las soluciones fueron vertidas en un equipo para gradientes y dicha mezcla se colocó entre dos vidrios con espaciadores de 0,75 mm y se deja polimerizar durante dos horas.

- Se llenó el gel con un stacking de poliacrialamida al 7%, con un ratio de acrilamida y bis-acrilamida de 37,5;1, este se mezcló con TAE 5X y enrazado en agua destilada
- A esta solución se adicionó70 µl de persulfato de amonio mas 5,4 µl de TEMED. Se vierte en las placas y se deja polimerizar por 2 horas.
- El producto de la PCR de DNA de las muestras de probióticos se colocaron en los geles de gradiente desnaturalizante 8 µl por muestras.
- La electroforesis se corrió a 60°C en dos etapas la primera durante 10 minutos a 20 voltios y la siguiente por 6 horas a 150 voltios.

5.3.3. Tinción geles de poliacrilamida(DGGE)

Se empleo la tinción de plata (AgNO3) siguiendo el protocolo descrito por Dinesh et al. (1995), con algunas modificaciones.

- Terminado el tiempo de la electroforesis, los geles fueron separados y colocados suavemente en las cubetas conteniendo las diferentes soluciones de tinción.
- De cada solución se utilizó 1,5 litros, siendo las soluciones de fijación y enjuague nuevas para cada tinción, las otras soluciones se reutilizaron hasta cinco veces aproximadamente.
- Pasos para la tinción con nitrato de plata. Tabla # 4.

Tabla # 4. Etapas para la tinción con Nitrato de Plata.

ETAPAS	REACTIVO	TIEMPO
1.Fijación	Etanol al 10% ……...…..150 ml Ácido acético al 0,5% ……..……..7,5 ml Enrasar con agua desionizada hasta 1,5 litros	15 minutos
2.Impregnación	$AgNO_3$……2,8 gr. Enrasar con agua desionizada hasta 1,5 litros	20 minutos
3. Enjuague	1,5 litros de agua desionizada	1 minuto
4. Revelado	NaOH (0,75 M)……..……45 gr. Formaldehído (0,085M) ……..….10,5 ml Enrasar con agua desionizada hasta 1,5 litros l	10 minutos
5.Parada	$NaCO_3$ (0,07 M)……11 gr. Enrasar con agua desionizada hasta 1,5 litros l	3 – 5 minutos

5.3.4. Fotografía y análisis de imagen.

- Los geles teñidos se fotografiarón con una cámara digital OLYMPUS C-5000 (5 Megapixeles: zoom óptico 3x de 38 mm – 14 mm), sobre una caja de luz blanca.
- Las fotografías fueron archivadas para su posterior análisis en formato TIFF y se procesaron mediante los programas “Adobe Photoshop” y “Gene Profiler”.
- Utilizando el programa “Gene Profiler” se determinaron la presencia o ausencia de bandas, así como la intensidad de las mismas. El programa se ajusta para considerar las bandas visibles, claramente definidas y representadas en un mínimo de 5% de intensidad total de la línea analizada.

5.3.5. Purificación de DNA a partir de geles de poliacrilamida

Una vez analizadas las imágenes de los geles, se seleccionó las bandas de mayor intensidad.

- Con un tip plástico de 1 ml se tomó una muestra de la banda de los geles de poliacrilamida y se los colocó en 50 µl de agua milliQ, se conservó las muestras en refrigeración por 48 horas aproximadamente
- Posteriormente tomar las muestras para una amplificación (PCR- 16S RNA), basado en el método descrito por Schaefer et al., (2001),
- Después de esta amplificación se corrieron geles de agarosa al 2% (w/v) y geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante para verificar la presencia de los productos amplificados.
- Obtenidas las muestras de DNA totalmente puras, se realizara una amplificación.

5.3.6. Clonaje de bacterias

Una vez confirmada la presencia del fragmento de interés. De los productos amplificados se tomó una muestra y se realizó la clonación a partir del kit de clonaje TA CLONING KITS, aplicando dos procedimientos:

Tabla # 5. Reacciones empleada en la clonación

MIX DE CLONAJE			
REACCION COMPLETA		**REACCION A LA MITAD**	
PCR (producto fresco)	4 µl	PCR (producto fresco)	2 µl
Solución salina	1 µl	Solución salina	0.5 µl
Vector	1 µl	Vector	0.5 µl
	6 µl		3 µl

- Dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 2 µl de reacción anterior en los recipientes de las células.
- Incubar 30 minutos en hielo, luego pasar a 42ºC por 30 segundos, transferir a hielo.
- Si la reacción es completa, añadir 250 µl del medio S.O.C caso contario se añade la mitad del medio a cada tubo.
- Cerrar los tubos y agitar a 200 rpm a 37ºC por 1 hora.
- Sembrar en placas de LB (con antibióticos 100 µl por caja). Se deja incubar a 37ºC por 24 horas. Posteriormente se realiza la extracción del ADN plasmídico.

5.3.7. Extracción de ADN plasmídico.

La extracción del ADN plasmídico se realizó siguiendo el protocolo "Short Protocols in molecular"

- Con un hisopo coger las bacterias crecidas en las placas y resuspenderlas en 400 µl de medio LB.
- Centrifugar por 1 minuto a 1300 rpm, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100µl de GTE (Glucosa Tris EDTA) dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente adicionar 200µl de Hidróxido de sodio (NaOH) y SDS mezclar bien y añadir 5 minutos en hielo.
- Adicionar 150µl de acetato de potasio, agitar por 2 segundos y colocar el tubo en hielo por 5 minutos.

- Centrifugar 5 a 10 minutos y transferir 400µl del sobrenadante en tubos nuevos, adicionar 800µl de isopropanol, agitar y dejar reposar 3 minutos a temperatura ambiente o dejarlo hasta el siguiente día a -20ºC.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 100 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar a 12000 rpm y eliminar el sobrenadante, secar el pellet a 40°C por 10 minutos, resuspender el DNA en 50 µl de agua milliQ.
- Realizar las lecturas de ADN.

5.4.Análisis y contraste de especies bacterianas de probióticos comerciales.

5.4.1. Secuenciación

El producto concentrado de la reamplificación se usó para la secuenciación que se realizó en la compañía de secuenciación comercial Macrogen.

La secuencia obtenida se analizó con bases de secuencias disponibles en la web por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)para determinar el nivel de correspondencia (Match) con secuencias publicadas en el Gen Bank e identificar las especies a las que pertenecen

6. RESULTADOS

6.1. Activación de probióticos comerciales.

La activación de los productos comerciales se realizó en diferentes tiempos (15, 30 y 60 minutos), las mejores concentraciones de ADN fueron los probióticos que se activaron por una hora (Tabla #1) estas se confirmaron posteriormente mediante amplificaciones de PCR.

6.2. Técnicas moleculares para identificación de especies.

6.2.1. Extracción de DNA, amplificación por PCR

La extracción de ADN se dificultó por la presencia de aditivos que se encontraban en los productos, obteniendo pellets no confiables para los análisis posteriores. Para conseguir la lisis celular en los productos estudiados se adiciona proteinasa K y varios pasos de centrifugación siguiendo el protocolo descrito por Smalla et al., 1993. En la extracción se obtuvo ratios entre 280/230 ng/µl estandarizando la técnica, las concentraciones mínimas de ADN óptimas para este estudio se registro en 60 ng/µl, que son concentraciones optimas para las amplificaciones (Tabla # 6) las cuales fueron confirmadas en geles de agarosa. Debido a bandas tenues que generaban ciertos productos de amplificaciones se estableció en algunos casos la adición entre 2 y 3 µl de ADN para la premezcla de la PCR de las siguientes pruebas.

Tabla #6. Concentración de ADN bacteriano de los productos probióticos evaluados

Probióticos	ADN ng/ µl
A	487
	1020
	592
	452
B	334
	347
	239
	236
	139

Los iniciadores PRBA338F-GC y 518R–1 ayudaron a determinar, que el tamaño del fragmento 16S rDNA es aproximadamente 200pb, en base a las amplificaciones realizadas por PCR, esto se pudo reflejar al migrar un gel de agarosa con producto de PCR de probióticos, demostrando que el producto amplificado es confiable. Fig. # 4

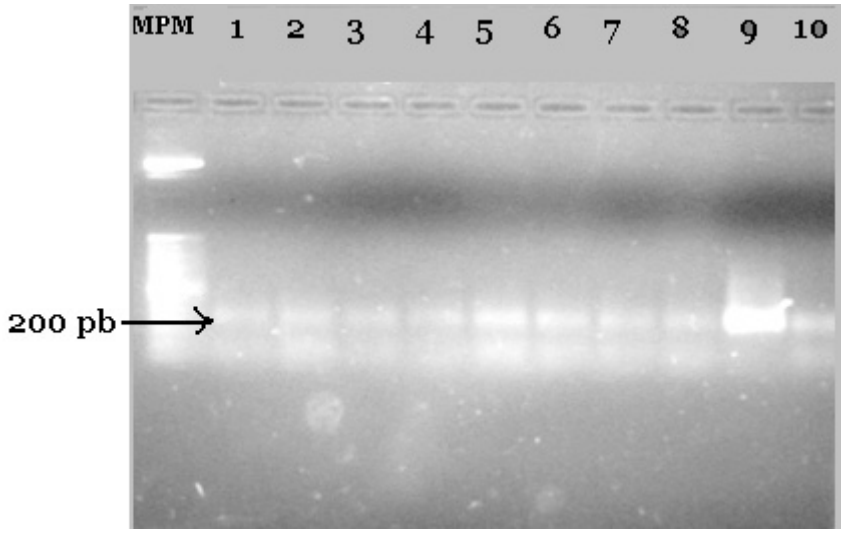


Figura # 4. Gel de electroforesis presenta productos amplificados por PCR los pozos del 1 al 5 representan al producto A; y pozos del 6 al 10 producto B. El marcador de peso molecular (M) es de 1 kb.

6.3. Identificación de especies a partir de DGGE.

6.3.1. Análisis en geles de gradiente desnaturalizante de los productos probióticos (DGGE)

La técnica DGGE generó perfiles diferentes para cada tipo de muestras de probióticos. Cada perfil genético estuvo constituido por un diverso número de bandas de diferentes intensidades, las cuales determinan la diversidad de especies en cada producto. En tanto en el probiótico A y B, a pesar de poseer numerosas bandas, se tomó en consideración solamente aquellas de mayor intensidad. Fig. #5

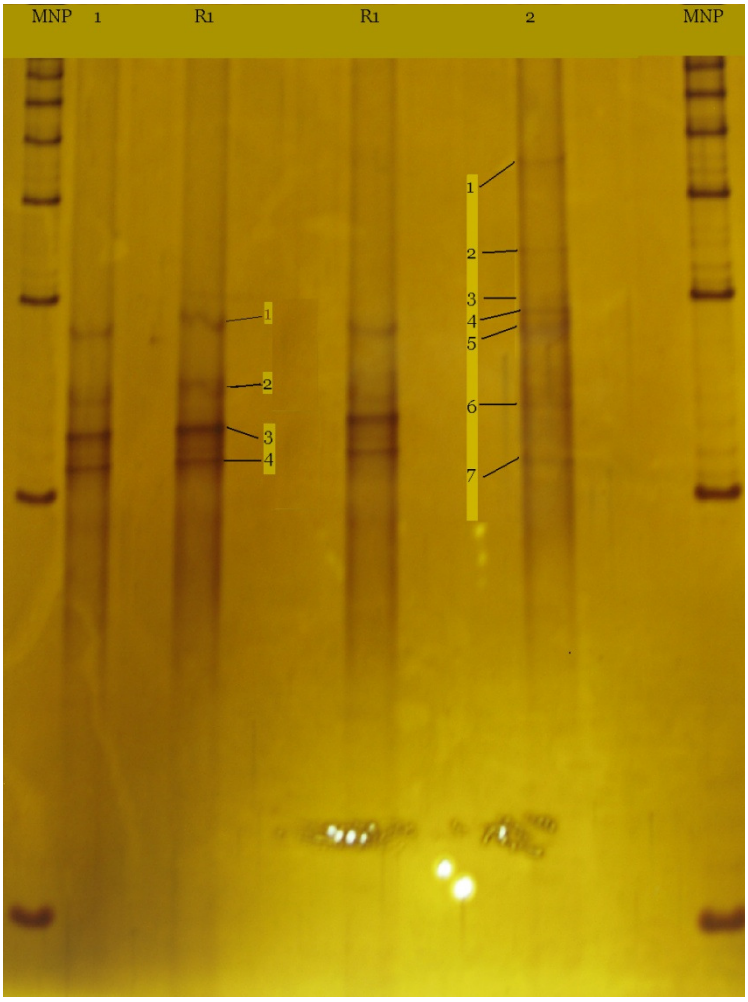


Figura # 5. Perfiles generados de secuencias de genes de 16S rRNA de aislados de probióticos comerciales, a partir de DGGE; MPM: Marcador; R:Réplica; 1=probiótico A, 2= probiótico B

Análisis de imagen.

El análisis de imagen de los perfiles de DGGE (Gene profiler 4.05) confirmó el número de bandas obtenidas en el análisis anterior, estas bandas se detectaron debido al porcentaje de intensidad mínimo de un 5 % respecto a la intensidad total de la línea Fig # 6 . Se obtuvieron 12 bandas entre tenues y muy visibles para el producto A, mientras tanto el producto B generó aproximadamente 18 bandas con las características del producto anterior.

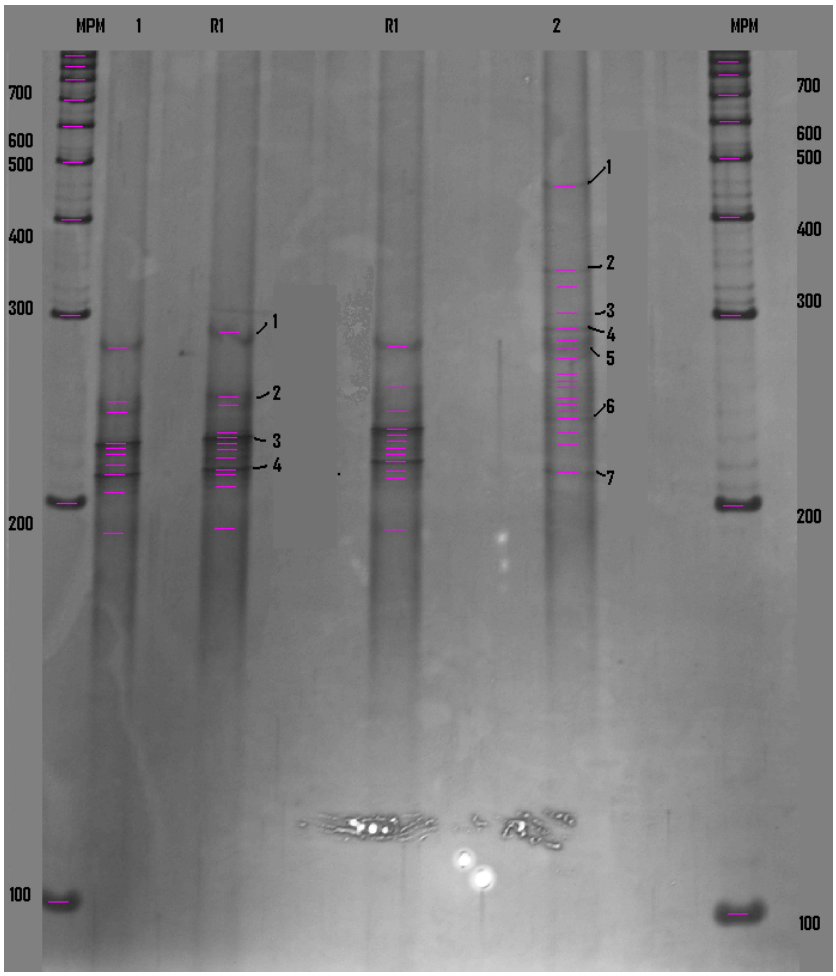


Figura # 6. Perfiles generados de secuencias de genes de 16S rRNA de aislados de probióticos comerciales y análisis de imagen con un porcentaje de intensidad (5% del total de la línea). ,MPM: Marcador; R:Réplica ; 1=probiótico A, 2= probiótico B

Las bandas obtenidas en los perfiles derivados de DGGE estimaron la diversidad bacteriana y su intensidad relativa determinó la presencia de especies que componen los probióticos.

Los análisis de las amplificaciones de los geles de DGGE con un gradiente desnaturalizante de 40% a 60% presentaron diferente movilidad para los productos probióticos analizados.

Así tenemos:

PROBIÓTICO A

A partir del análisis de DGGE se reveló que en el producto A, existen 4 bandas con tamaño que oscila entre 210 y 272 pb muy bien definidas y otras 2 de menor intensidad de igual forma se las tomaron para el respectivo análisis, estas representan el número de especies que se encuentran en este probiótico Fig. # 6.

PROBIÓTICO B

En el producto B hay una predominancia de 7 bandas con un tamaño que va de 211 a 491 pb, que determinan el número de especies que se encuentran en este producto Fig. #5 y 6.

6.3.2. Purificación de DNA a partir de geles de poliacrilamida

Las bandas con intensidad mayor se cortaron de los geles para posteriores purificación, clonaje, secuenciación y análisis, para ello se ensayaron dos métodos, uno donde se cortaron los fragmentos y otro donde se tomaron muestras con ayuda de tips descartables (Fig. #7)

La mejor concentración y purificación de ADN se obtuvo con los tips y en 30 µl de agua Milliq. De estas bandas obtenidas se realizó amplificaciones después de 48 horas, el material obtenido de PCR fue utilizado para posteriores análisis de clonación.

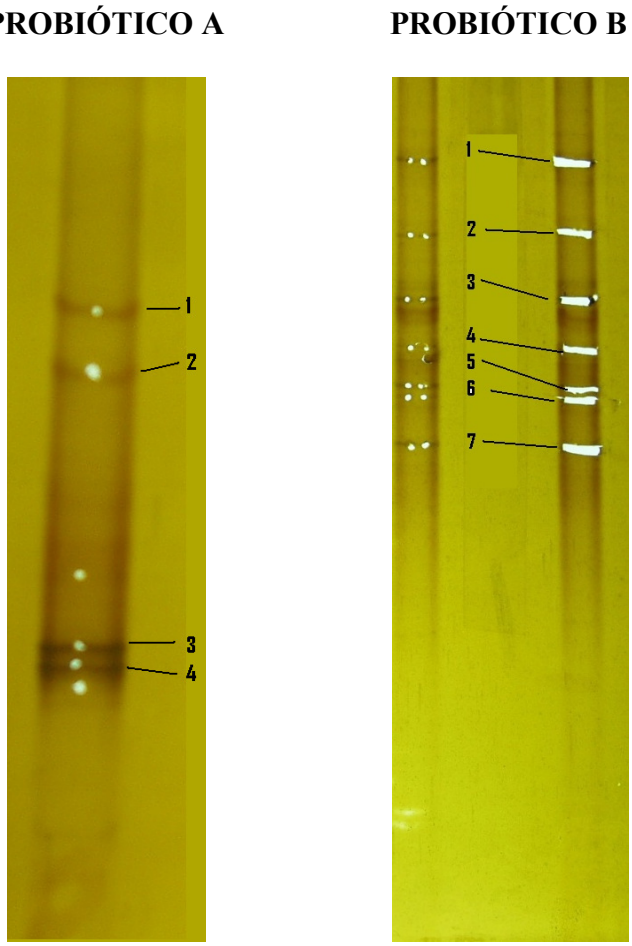


Figura # 7. Cortes de bandas para purificación, probiótico A presenta 4 bandas predominantes, y el probiótico B siete bandas predominates

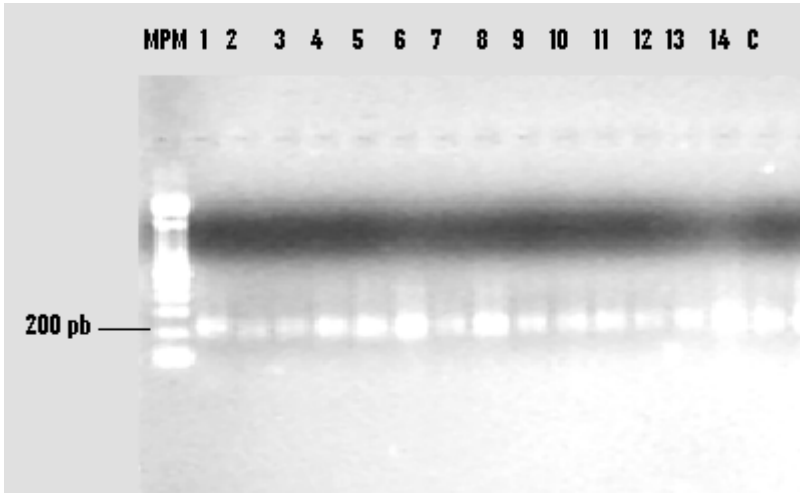


Figura # 8. Electroforesis en gel de agarosa (2%) del fragmento (16S rDNA) amplificados por PCR. 1Kb marcador de peso molecular. Línea M, marcador, línea del 1al 7 muestras de bandas obtenidas de producto A, línea 8 al 14 bandas obtenidas del producto B.

6.3.3. Clonación de bacterias

Con el objetivo de expresar selectivamente el gen 16S rDNA y obtener fragmentos de ADN independiente, se realizó el análisis de clonación de los perfiles de las bandas a partir de la DGGE. De la escisión de las bandas clonadas se obtuvo, 61 clones (36 Producto A y 25 del producto B) recuperados en Agar LB, de estos clones se seleccionaron 10 por cada producto para su posterior secuenciación, esta elección se basa en la similitud de las bandas. En este caso las bandas 5,6, 7, 8 poseen el mismo perfil, de estas con similitud se seleccionan dos y las otras muestras serán de diferentes bandas para una mejor selección y obtención de bandas (Figura # 9 y Anexo A).

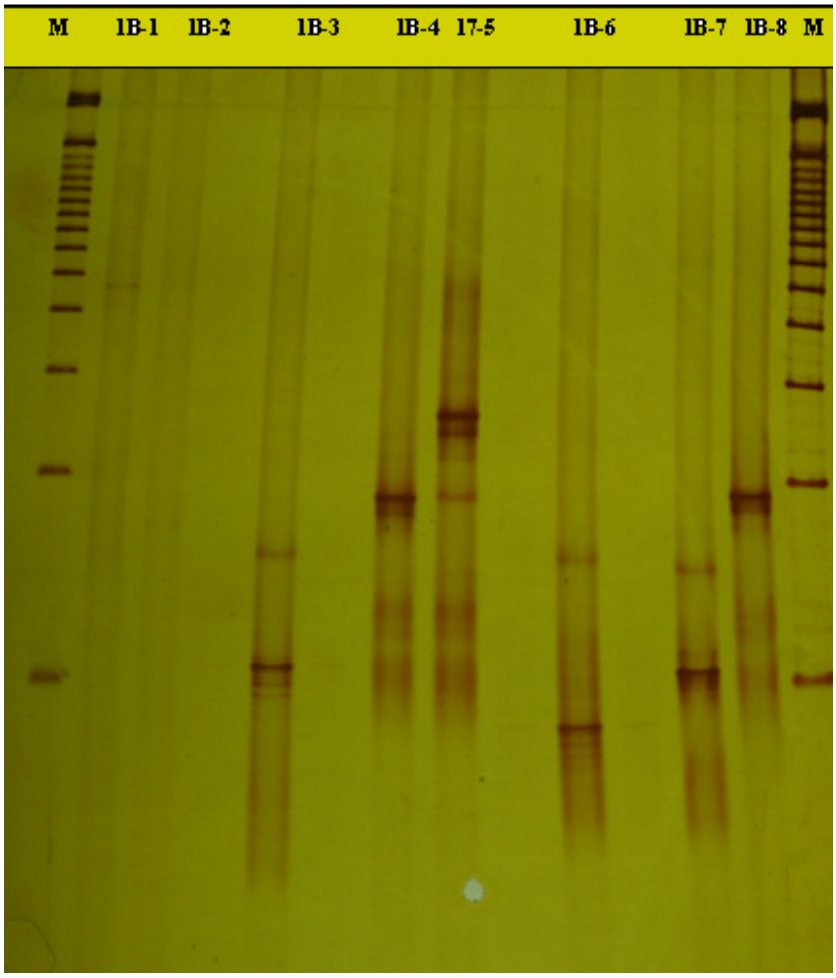


Figura # 9. Perfiles generados por clones obtenidos de probióticos comerciales. M: Marcador; B= clones del probiótico B

6.4.Análisis y contraste de especies bacterianas de probióticos comerciales.

6.4.1. Secuenciación

Las secuencias obtenidas de los productos en estudio fueron muy bajos y no permitieron identificar a nivel de especies, con excepción de 4 clones del producto B que identificó a 4 géneros: *Lactobacillus sp., Bacillus sp., Acetobacter* sp. y *Saccharomyces sp.*

El análisis de secuencia en el programa Blast demuestra que en el producto A existen 3 especie identificadas que corresponde a *Acidobacteria bacterium, Vogesella, Phaseolus vulgaris*. (Anexo B y C), con un porcentaje de similitud en especies de 98%, 97% y 99% respectivamente (Tabla #7). Demostrando que las especies que se registran en la etiqueta de este producto no se encuentran identificadas (Tabla #8). En tanto las especies reportadas para el producto B son *Lactobacillus sp., Acetobacter sp., Bacillus sp. Saccharomyces sp.*, (Anexo D y E) de estas especies únicamente *Lactobacillus sp*. se encuentra declarado en la composición del producto comercial. (Tabla #9).

Especie identificada	**Peso molecular (pares de base)**	**% de similitud**	**Producto**
Vogesella	209	97	Producto A
Phaseolus vulgaris	187	99	Producto A
Lactobacillus sp	249	99	Producto B
Bacillus sp.	210	99	Producto B
Saccharomyces sp	184	100	Producto B

Tabla #7. Especies identificadas mediante secuenciación a partir de DGGE

CONTRASTE DE ESPECIES:

ESPECIES REGISTRADAS EN PRODUCTO A	**Identificadas por DGGE**
Bacillus subtilus	x
Bacillus sp.	x
Bacillus pumilus	x

Tabla #8. Contraste de especies de producto probiótico A

ESPECIES REGISTRADAS EN PRODUCTO B	**Identificadas por DGGE**
Pseudomonas aureginosas	x
P. fluorensis	x
Bacillus subtilus	x
Lactobacillus sp.	√
Bacillus licheniformis	x

Tabla #9. Contraste de especies de producto probiótico B

DISCUSIONES

Los análisis realizados en los productos probióticos, demuestran que este tipo de técnica molecular de cultivo independiente provee diferentes perfiles que representan la diversidad genética de estos productos, confirmando que estas técnica molecular se caracteriza por ser rápidas y capaz de proveer un perfil que representa la diversidad genética de una comunidad microbiana de un ambiente específico (Ercolini, 2003), incrementando el estudio de diversidad microbiana (Díaz, 2003).

Ercolini 2003, cita que la técnica ha demostrado tener un gran potencial en microbiología de los alimentos. El análisis de PCR-DGGE es capaz de proporcionar rápidamente la composición de poblaciones microbianas en productos alimenticios y el análisis de la dinámica de la comunidad en alimento en respuesta a cambios ambientales. Cocolin, 2001, también ha aplicado esta técnica para el estudio de sistemas microbianos en alimentos fermentados, debido a que muchos microorganismos son difíciles de recuperar por los métodos tradicionales, es decir no son cultivables. Sin embargo es muy poco utilizada como herramienta para el estudio de la diversidad microbiana en productos acuícola. La aplicación de esta técnica en esta investigación es uno de los primeros en estimar comunidades bacterianas en productos probióticos para acuicultura. Permitiendo aportar información de identidad y número de especies

de productos probióticos, demostrando que puede representar una herramienta para el control de calidad (Ercolini, 2003).

Ercolini et al. (2002) usó esta técnica para desarrollar perfiles específicos en el análisis de quesos, no es muy confiable debido a que se originan diferentes perfiles de DGGE, en un solo tipo de muestra. Esto puede deberse a que no todas las especie poseen la misma sensibilidad a los agentes que provocan la lisis celular y la diferencia se debe principalmente a la organización de la pared celular, razón por la cual la purificación de los ácidos nucleícos suele ser difícil, así el alto rendimiento del ADN deseado podrá variar la detección de las especies que habitan en ese medio (probióticos comerciales).

De acuerdo con Wilson, 1997 cuando el ADN extraído se utiliza como muestra para la PCR, la matriz de residuos podrían actuar como inhibidores, la muestra patrón, es la más difícil de lograr una buena extracción debido a que hay que deshacerse de todas las impurezas que pueden afectar negativamente a la amplificación. Pudiendo ser la razón de que la extracción de ADN de las muestras patrones de estos productos fue particularmente difícil, de hecho, la presencia de componentes naturales, tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, colorantes, pudieron hacer que la extracción de ADN se vuelva difícil y algunas de estas moléculas pueden persistir hasta el final de la extracción y se encuentran en el extracto, razón por la cual no obtuvo en ciertos casos cantidades de ADN buenas para las amplificaciones.

Aunque los resultados de este trabajo se basan nada más que en el análisis de la región V3 de secuencia 16S rDNA en la bibliografía existe información relevante que nos sugiere que la elección de iniciadores y de las secuencias variables a analizar, tienen que ser adecuada (Ercolini et al., 2003a) debido a que los análisis de diferentes regiones variables del fragmento 16S, pueden presentar resultados diferentes en la composición de especies de una misma muestra. De hecho, la presencia de leuconostoc en el queso Stilton pudo ser revelado sólo mediante el análisis de la región V4-V5 del 16S rDNA, mientras que la especie no se detectó cuando la región fue blanco V3 (Ercolini et al., 2003a). Sin embargo, aunque es una región específica, se deben realizar diversos experimentos con diferentes regiones variables, aunque esto demandaría mucho más tiempo, pero es necesario para poder detectar si otras especies de microorganismos están presentes pero no se detecta.

Al analizar las bandas obtenidas en el gel de DGGE de esta investigación presenta fragmentos que se encuentran en un rango de 200 a 300 pb, cuyos resultados concuerdan con los obtenidos por Ercolini (2004), quien reportó que los fragmentos identificables por DGGE no podrían superar a 500pb, aunque esto es un factor limitante para lograr una identificación confiable de la especies microbianas, porque las secuencias de las bandas de DGGE para ser comparadas en las bases de datos son relativamente pequeños fragmentos de ADN 16S, y un fragmento puede contener mas una especies.

Ercolini et al., 2001a, 2003a; Van Beek, 2002; Meroth et al., 2003, estudiaron la comigracion de los fragmentos de ADN y afirman que esto se debe a que muchas especies de bacterias están estrechamente relacionadas y que el fragmento 16S rDNA analizado no puede contener grandes diferencias que permitan la separación de las bandas en DGGE. La separación de las bandas en DGGE es satisfactoria mediante el uso de diferentes iniciadores o una mejor adecuación de las condiciones de gradiente en DGGE. Razón por la cual es necesario probar diferentes gradientes de desnaturalización para poder separar las bandas, y obtener con ello distancias entre los fragmentos muy largas y así poder realizar una extracción de muestras de bandas para su debida purificación.

CONCLUSIONES

- La aplicación de la técnica DGGE en el análisis de los productos probióticos, fue una manera rápida de obtener perfiles que representan la diversidad de especies.

- Los iniciadores (primer) utilizados en la amplificación del gen 16S rDNA no brindó información confiable para obtener una identificación a nivel de especies.

- Los perfiles obtenidos en los geles de Gradiente permitieron detectar la presencia de al menos 4 especies bacterianas en el producto A y de 7 especies en el producto B de los cuales solo se identifican 4 géneros (*Lactobacillus sp., Bacillus sp., Acetobacter sp.y Saccharomyces sp)*.

- En base a este estudio se demuestra que la información declaradas en la etiquetas de los productos probióticos no son confiables debido a que no se detectaron especies registradas en las etiquetas del producto A, en tanto el producto B detecto la presencia de *Lactobacillus sp.* esta especie si se encuentra registrada en la etiqueta.

RECOMENDACIONES

- Evaluar con la técnica de cultivo independiente (DGGE) con otros productos probióticos comerciales de interés acuícola

- Realizar nuevos ensayos de identificación de especies, mediante la elección de otros iniciadores y de secuencias variables para detectar si otras especies de microorganismos están presentes

- Evaluar diferentes gradientes de desnaturalización para obtener distancias significativas entre los fragmentos y poder realizar la escisión de bandas y por ende purificación de estas.

- Incrementar la confiabilidad de los productos utilizados en la industria camaronera, solicitando a los proveedores el tipo de análisis que realizan para detectar las especies que se encuentran en sus productos.

BIBLIOGRAFÍA

Alavandi, S. V., K. K. Vijayan. T. C. Santiago, M. Poornima, K. P. Jithendram, S. A. Ali y J. J. Rajan. 2004 Evaluation of Pseudomona sp. PM 11 and Vibrio Fluvialis PM 17 on immune indices of tiger shrimp, Penaeus monodon. Fish shellfish Immunol., 17(2): 115-120

Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C.,Wacher, C., Guyot, J.-P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5464– 5473.

Araya, R., Leiva. J. C., & Valdés, J. 2008. Molecular characterization of bacterial communities associated to sediments in the northern Humboldt Current system, Mejillones del Sur bay, Chile. Rev. biol. mar. oceanogr. v.43 n.3

Balcázar J.L., 2002 Evaluación de mezclas de cepas probióticas en juveniles *Litopenaeus vannamei.* Tesis para obtención de Ingeniero acuicultor. Universidad de Machala. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Machala – Ecuador.

Balcázar, J,L., De Blas, I. Ruiz,I. Cunningham, D. Vendrell, D. Múzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Microbiology veterinary. Elsevier 114, 173–186

Balcázar, J.L., 2002. Use of probiotics in aquaculture: general aspects. In: de Blas, I. (Ed.), Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, Zaragoza, Spain, 877–881.

Balcázar, J.L., T. Rojas –Luna y D.P. Cunningham. 2007c. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific White shrimp (Litopenaeus vannamei) following immersion challenge with Vibrio parahaemolyticus. J. Inverter. Pathol., 96(2): 147-150

Bano. N., J. T. Hollibaugh. 2002. Phylogenetic Composition of Bacterioplankton assemblages from the Artic Ocean. Applied and Environmental Microbiology. 68: 505 – 518.

Blackwood, C. B., T. Marsh, S. H. Kim, and E. A. Paul. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. Applied and Environmental Microbiology. 69: 926 – 932.

Borbor, M., 2005 "Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturante (DGGE)." Tesis de Biólogo Marino, UPSE, Ciencias del Mar, Santa Elena, Ecuador.

Cahill, M. M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. Microb. Ecol. 19:21– 41.

Cecile, S. 2006. Utilisation d` un biossai Artemia pour caractériser les molecules actives d`une preparation microbienne commerciale à base de lactobacilles sur la physiologie digestive de crustaces. Université Pierre et Marie Curie, Francia.

Cejudo, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J., Mariscal, V., Fernández, E., 2008. Manual de aislamiento y purificación del DNA de un plásmido Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales

Chiu, C. H., Y. K. Guu, C. H. Liu,T. M. Pan y W. Cheng. 2007. Immune responses and gene expression in White shrimp, Litopenaeus vannamae, induced by Lactobacillus plantarum. Fish. Shellfish. Immunol., 23 (2): 364-377.

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2001c. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5113–5121.

Concepción J. Puerta B. y Claudia P. Ureña P. Prácticas de biología molecular pág. 64 Pontifica universidad Javeriana.

Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, and J. E. Hobbie. 2003. Bacterioplantkton Community shifts in Artic Lake correlate with seasonal changes in organic matter source. Applied and Environmental Microbiology 69: 2253 – 2268.

Cytryn, E., I. Gelfand, Y. Barak, J. Van Rijn and D. Minz. 2003. Diversity of microbial communities correlated to physio chemical parameters in a digestion basin of a zero discharge mariculture system. Environmental Microbiology. 5: 55 – 63.

Dalmin, G., Kathiresan, K., Purushothaman, A., 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Indian J. Exp. Biol. 39, 939–942.

Díaz, G., C. Wacher. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 45: 30 – 40.

Díez, B Pedrós-Alió, C Marsh,T and Massana, R 2001 Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques Applied and Environmental Microbiology 67: 2942-2951

Douillet, P. (2000). Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. Aquaculture 182:241-248

El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effect of phenylúrea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. Applied and Environmental Microbiology 65: 982– 988.

Ercolini D., 2003 PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods 56 297– 314

Erlich, H.A. y N. Arnheim. 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. Ann. Rev. Genetic. 26:479-506.

FAO WHO, 2001. Report of a joint FAO WHO expert consultation on evaluation of heat and nutricional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina .

Farrés, A., Ampé, F., Escalante, A., Flores, M.T., Guyot, J.P., Marlon Guyot, J., Romero, M.T., y Wacher, C 1999 Determinación de la diversidad Bacteriana del Pozol: Un Enfoque polifasico. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. 112-113.

Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., Torriani, S., 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. Int. J. Food Microbiol. 82, 59– 70.

Fischer, S.G., and L.S. Lerman. 1979. Length independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. Cell 16:191-200

Fontana, C. Vignolo, G. Cocconcelli, P. 2005. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. Journal of Microbiological Methods. 63:254 – 263.

Gainza R., 2009 Terapia antimicrobiana con enrofloxacina en camaricultura, Cámara Nacional de Acuicultura. Rev 76: 44-45

Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Acuaculture. Review.180, 147-165

Gottlieb AM, Ferrer E, Wright JE. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of Ganoderma. Mycol Res 104:1033–1045

Hagiwara, A., K. Hamada, S. Hori and K. Hirayama. 1994. Increased sexual reproduction in Brachionus plicatilis (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 181:1–8. 88.

Harris, J. M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microbiology Ecology. 25:195–231.

Heath, S., S. Pak, S. Marshall, E.M. Prager & C.Orrego. 2000. Monitoring genetic diversity inPiscirickettsia salmonis by denaturant gelelectrophoresis and assessment of bacterial burdenby competitive PCR. Diseases of AquaticOrganisms, Vol. 41:19-29

Hewson, I., J. A. Fuhrman. 2004. Richness and diversity of bacterioplankton Species along an Estuarine Gradient in Moreton Bay, Australia. Applied and Environmental Microbiology. 70: 3425 – 3433.

Ji, N., B. Peng, G. Wang, S. Wang, X. Peng. 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. Journal of Microbiological Methods. 57: 409 – 413.

Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Kimura, T., 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. Microbiol. Immunol. 32, 67–73.

Kawai, M., E, Matsutera, H. Kanda, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. 2002. 16S Ribosomal DNA – Based Analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 68: 699 – 704.

Kirk, J. L., L. Beaudette, M. Mart, P. Moutoglis, J. Klironomos, H. Lee, J. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods. 58:169 – 188.

Kurkela T, Hanso M, Hantula J. 1999. Differentiating characteristics between Melampsoridium rusts infecting birch and alder leaves. Mycologia 91:987–992.

Laloo, R., S. Ramchuram, D. Ramduth, J. Gorgens y .Gardiner. 2007. Isolation and selection of Bacillus spp. As potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Jour. Appl. Mcrobiol., 103: 1471-141479

Lin, C. K. 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand, p. 13–23. In C. L. Browdy and J. S. Hopkins (ed.), Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture ’95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.

Llobet-Brossa, E., Rossello- Mora. R& Amman. R. 1998. Microbial community composition of wadden sea sediments as reveled by fluorescence in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology, 64: 2691-2696

López, R. S., Toranzo, E., 2003. Protocolo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detección e identificación de Pseudomonas anguilliseptica a

partir de cultivos puros del microorganismo y de tejidos de peces. N° publ. 2 264 303

Marshall, S., S. Heath, V. Henríquez & C. Orrego.1998. Minimally invasive detection ofPiscirickettsia salmonis in cultivated salmonids viathe PCR. Applied and environmentalMicrobiology, Vol. 64, Nº 8, 3066-3069.

Metchnikoff E (1907): Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. The prolongation of life: optimistic studies. W. Heinemann, London: 161-183.

Mialhe, E., Bachare, E., Boulo, V., Cadoret, J P., Rousseau, C., Cedeño, V., Saraiva, E., Carrera, L., Calderon, J. & Colwell, R.R. 1995. Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. Molecular Marine biotechnology, 4:275-283

Montoya, N., Reyes, E., Toro, L., 2003. Acumulación /Eliminación de Oxitetraciclina en el camarón blanco (Litopenaeus vannamei) y su realidad frente a la enrofloxacina en dietas artificiales en dietas para camarones.

Moriarty, D. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164:351–358.

Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73:127–141

Muyzer, G., De Waal, E.,C. and Uitierlinden, A.,C. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction Amplified Genes Coding for 16S rRna Applied and environmental microbiology. 59: 695-700

Ogier, J. Lafarge, V. Girald, V. Rault, A. Maladen, V. Gruss, A. Leveau, J, Y. And Delacroix Buchet, A. (2004). Molecular Fingerprinting of Dairy Microbial Ecosystems by Use of Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 70: 5628– 5643.

Orberá, R. T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Revista Iberoamericana de Micología. 21: 15 – 19.

Prieur, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A., Vigneulle, M., 1990. Interactions between bivalves molluscs and bacteria in the marine environment. Oceanogr. Marine. Biology Annual. Rev. 28, 227–352

Ranjard, L., F. Poly, S. Nazaret. 2000. Monitoring complex bacterial comunities using culture independent molecular techniques: application to soil environment. Res. Microbial. 151: 167 – 177

Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul, and P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp Penaeus monodon survival and growth. Aquaculture 167:301–313.

Ringø, E., and T. H. Birkbeck. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquacult. Res. 30:73–93.

Rodicio. M.R y Mendoza M.,C. 2004 Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin; 22(4): 238-45 243

Rodríguez, S. I., H. A. Barrera. 2004.La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos decádas de su invención. Ciencia UANL. 3: 323 – 335.

Röling, W.F.M., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H., van Verseveld, H.W., 2001. Microorganisms with a taste for Vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian Vanilla curing. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1995–2003.

Rombaut, G., G. Suantika, N. Boon, S. Maertens, P. Dhert, E. Top, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. Aquaculture. 198: 237 – 252.

Sakata, T., 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish.In: Lesel, R. (Ed.), Microbiology in Poecilotherms. Elsevier,

Sanz .Y, Collado M.C., Dalmau J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta pediatrica española Vol 61 9: 476-482.

Schaefer, H and G. Muyzer. 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology. Methods in microbiology. 30: 425 – 466.

Schwieger, F., C. C. Tebbe. 1998. A new Approach to utilize PCR Single Strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology. 64: 4870 – 4876.

Skjermo, J., I. Salvesen, G. Oie, Y. Olsen, and O. Vadstein. 1997. Microbially matured water: a technique for selection of a nonopportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. Aquacult. Int. 5:13–28.

Smit, E., P. Leeflang, S. Gommans, J. V. D. Broek, S. V. Mil y K. Wernars.2001. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a wheat field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. Applied and Environmental Microbiology. 67: 2284 – 2291.

Sotomayor M. A.; Aquino D; Echeverria F. 2009. Evaluación de productos extracelulares y cepas probioticas en la estimulación de la actividad enzimática en Penaeus vannamei. Cenaim- Espol

Temmerman. R., I. Scheirlink, G. Muys y J. Swings. 2003. Culture Independent Analysis of probiotic Products by Denaturing Gradient gel Electrophoresis. Applied and environmental Microbiology. 69:220 – 226.

Traian B, B van Breukelen, M Braster, N van Straalen & W Röling. 2008. Spatial heterogeneity in sediment-associated bacterial and eukaryotic communities in a landfiell leachate-contaminated aquifer. FEMS Microbiology Ecology 65: 534-543.

Van Beek, S., Priest, F.G., 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. Appl. Environ. Microbiol. 68, 297– 305.

Verschure, L., J, Dhont., Sorgeloos, P., and Verstraete, W., 1997. Monitoring biolog pattern and r/k satrategists in the intensive culture of Artemia juveniles. J. Appl. Microbiol., 83: 603-612

Verschure, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 655–671

Verschure, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 655–671

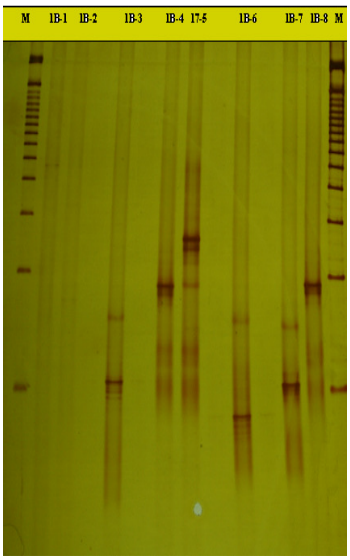
Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3741– 3751

Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev 1987; 51:221-7.

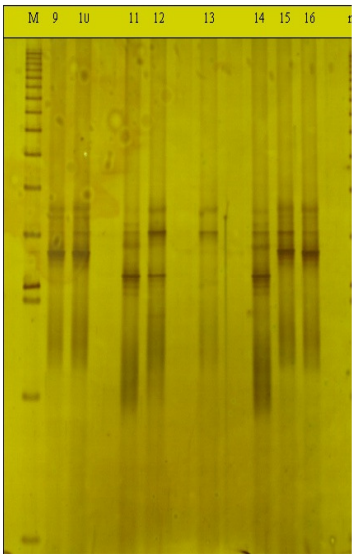
ANEXOS

ANEXO A

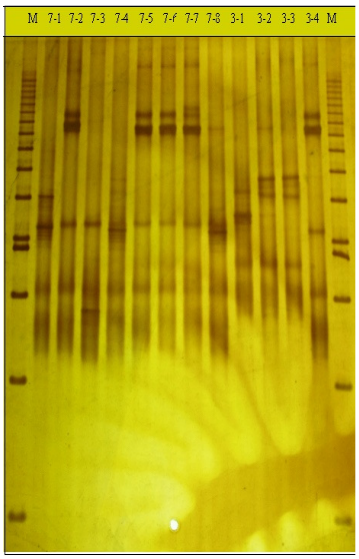
CLONES OBTENIDOS DE LAS BANDAS DEL PRODUCTO A



Banda 1



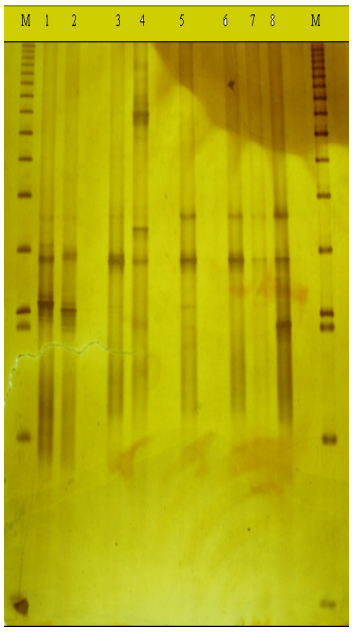
Banda 2



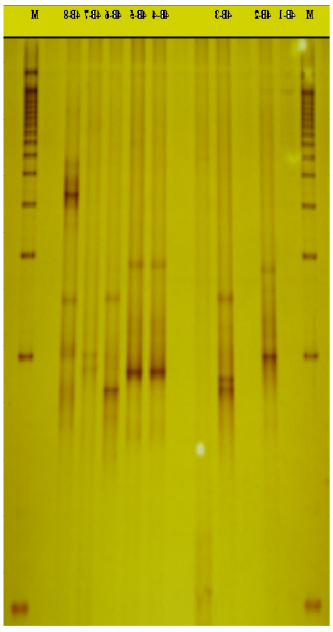
Banda 3 y 4

CLONES DEL PRODUCTO A

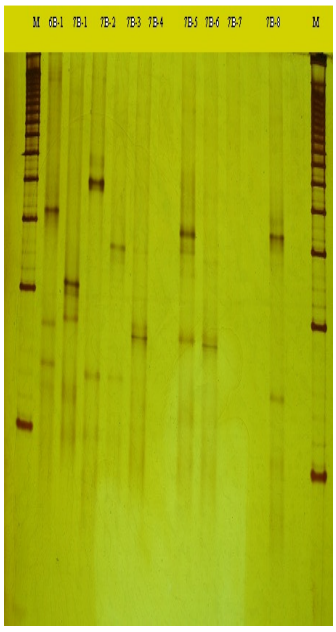
CLONES OBTENIDOS DE 4 DE LAS 7 BANDAS DEL PRODUCTO B



Banda 1B



Banda 4B



Banda 6B y 7B

CLONES DEL PRODUCTO B

ANEXO B

SECUENCIAS DEL PRODUCTO "A"

Las secuencias obtenidas, demuestran las especies de bacterias, que se encuentran en los probióticos estudiados no se destacan en la descripción de los productos:

MUESTRA A4

En el análisis del Blast se obtuvo del clon de la banda A4 la siguiente secuencia con 187 pb (pares de bases):

CGGCTTATTACCGTGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGATGCTTATTCCCCGG
ATACCGTCATTGCTTCTTCTCCGGGAAAAGAAGTTCATGACCCGTAGGCCTT
CTACCTTCACGCGGCATTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGGAAAATTC
CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCAAGCCG

Esta secuencia determina la presenciade *Phaseollus vulgaris*, esta cepa no se encuentra identificada en este producto.

MUESTRA A2

La secuencia obtenida, representa a la especie *Vogesella sp*. y posee 209pb.

CGGCTTGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGC
GAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTCTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA
AAGGACTTTGGTCAGGGAGGAAATCCCCAGAGCTAATACCCTTGGGGGATG
ACAGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
AGCCG

Las demás bandas analizadas del producto A, poseían secuencias existentes que fueron muy bajas por lo tanto no se pudo obtener identificaciones a nivel de especies.

ANEXO C

ESPECIES OBTENIDAS EN EL GEN BANK DEL PRODUCTO A

	Muestras Bandas		Gen BANK	pb	% de confianza
PRODUCTO A	A1	**EU425889**	Acidobacteria bacterium clone D1	47	98
	A1	**Plasmido cerrado**		724	
	A2	**AM989121.1**	Vogesella sp. AKB-2008-TE22 partial 16S rRNA gene, strain AKB-2008-TE22	209	97
	A2	**EU585925.1**	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band DS34-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	193	99
	A3	**Secuencia corta**	No match	64	
	A3	**AB2533782.2**	Uncultured bacterium gene form 16S rRNA , partial sequence clone: CLA76	47	99
	A3	**Plasmido cerrado**	No datos	807	
	A4	**EU585925.1**	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band DS34-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	200	99
	A4	**FJ175148.1**	Uncultured bacterium clone sbrh_193 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	224	100
	A4	**DQ886273.1**	Phaseolus vulgaris cultivas negro Jamapa Chloroplast	187	99

ANEXO D

SECUENCIAS DEL PRODUCTO "B"

De las siete bandas que predominan en este producto se identificaron las siguientes secuencias.

Banda B1

Se envió de la banda 1 dos muestras, debido que en la clonación se obtuvieron muchos clones de los cuales seis eran de igual perfil y dos de diferente perfil. Así tenemos que el primer clon de la banda Nº1 se identifica como *Lactobacillus* con un con una secuencia de 249 pb.

CGGCTTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATCGG
ATACCGTCACTACCTGGCCAGTTACTACCAGATACGTTCTTCTCCGATAACA
GAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGA
CTTCCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCCCC
CGTGCCCCCGCCCCGCCCGCCGCGCGCGGCGGGAAGCCG

El segundo clon seleccionado de la banda B1, presento 195 pb y 95% de probabilidad que pertenece a la especie *Acetobacter sp.*tal como demuestra la secuencia:

CGGCTTGGCACGGGGGGACTCCGACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGG
ACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTT
CGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAG
AAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAGCCG

Banda 3

Esta banda del producto B se identifica como *Bacillus* sp. y posee una secuencia de 200pb, la secuencia obtenida es la siguiente.

CGGCTTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAG
GTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAAC
AGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAG
ACATTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTAAGC
CG

Banda 4
Las secuencia obtenida en este clon pretenece a la especie *Saccharomyces sp.* con 184 pares de bases y un vel de confianza del 100%

CGGCTTATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGTTCCTCG
TTAAGGTATTTACATTGTACTCATTCCAATTACAAGACCAAAGGCCCTGTAT
CGTTATATATTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCC
TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCCCCCCGTGCCCCCGCCGCCGCGCGCGGCGGG
CGAAGCCG

Bandas 5 y 7
Estas bandas se identifican en como *Myroides sp.*

Bandas 6
Se identifican dos especies *Saccharomyces sp* identificada anteriormente. y *Myroides sp*.

ANEXO E

ESPECIES OBTENIDAS EN EL GEN BANK DEL PRODUCTO B

	Muestras Bandas		Gen BANK	pb	% de confianza
PRODUCTO B	B1	**AY683322.1**	Lactobacillus concavus strain AS 1.5017 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	247	99
	B1	**EU648141.1**	Acetobacter sp. MUU19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	195	98
	B2	**Plasmido cerrado**		650	
	B2	**Plasmido cerrado**		844	
	B3	**EF612339.1**	Bacillus sp. OS-16B 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	210	99
	B4	**DQ345283.2**	Saccharomyces sp. WW-W46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	184	100
	B4	**FJ235675.1**	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band he-45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	198	
	B5	**FJ596350.1**	Myroides sp. UST050418-261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	233	100
	B6	**FJ596350.1**	Myroides sp. UST050418-261 16S ribosomal RNAgene, partial sequence	243	99
	B6	**DQ345283.2**	Saccharomyces sp. WW-W46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	215	100
	B7	**FJ596350.1**	Myroides sp. UST050418-261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	243	99