



CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLOGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Evaluación del potencial probiótico de
Exiguobacterium mexicanum 8N DSM 16483^T y
Microbacterium sp. 8L DSM 16485^T en cultivos
gnotobióticos y agnotobióticos de *Artemia franciscana*
(Kellogg 1906)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

César Orozco Medina

La Paz, Baja California Sur, Noviembre del 2008

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 21 del mes de Noviembre del año 2008, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

“Evaluación del potencial probiótico de *Microbacterium* sp. 8L DSM 16485^T y *Exiguobacterium mexicanum* sp. 8N DSM 16483^T en cultivos gnotobióticos y agnotobióticos de *Artemia franciscana* (KELLOGG 1906)”

Presentada por el alumno:

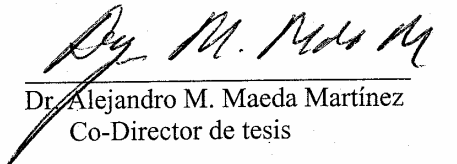
César Orozco Medina

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES, con orientación en Acuicultura. Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



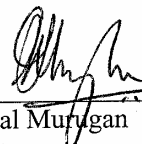
Dr. Alejandro López Cortés
Co-Director de tesis



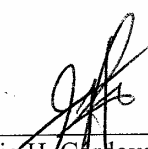
Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Co-Director de tesis



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Tutor



Dr. Gopal Murugan
Co-Tutor



Dr. Julio H. Córdova Murueta
Co-Tutor



Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Directora de Estudios de Posgrado

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

El presente trabajo de investigación se desarrolló principalmente en:

Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, CIBNOR, México;
Laboratorio de Microscopía Electrónica, CIBNOR, México;
Laboratorio de Histología e Histoquímica, CIBNOR, México;
Laboratorio de Bioquímica, CIBNOR, México;
Department Unité Mixte de Nutrition des Poissons, INRA-IFREMER, Brest Francia

El comité tutorial y revisor de tesis estuvo integrado por:

Dr. Alejandro López Cortés (Co-director)
Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, CIBNOR

Dr. Alejandro M. Maeda Martínez (Co-director)
Laboratorio de Carcinología, CIBNOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez (Co-tutor)
Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos, CIBNOR

Dr. Gopal Murugan (Co-tutor)
Laboratorio de Carcinología, CIBNOR

Dr. Julio H. Córdova Murueta (Co-tutor)
Laboratorio de Bioquímica, CIBNOR

El comité sinodal estuvo integrado por:

Dr. Alejandro López Cortés
Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Dr. Julio H. Córdova Murueta
Dr Gopal Murugan
Dr. Ángel I. Campa Córdova (como suplente del Dr. Dariel Tovar Ramírez)

RESUMEN

Todas aquellas bacterias que son administradas y entran al tracto gastrointestinal manteniéndose vivas y mejorando la salud del huésped son consideradas probióticas, no obstante, para la evaluación del potencial probiótico una cualidad indispensable es la capacidad antagónica hacia patógenos. Estudios gnotobióticos demostraron la capacidad benéfica de la mezcla de cepas *Exiguobacterium mexicanun* 8N DSM 16483^T y *Microbacterium* sp. 8L DSM 16485^T en el desarrollo y crecimiento larval de *Artemia franciscana*, sin afectar su supervivencia. En la presente tesis se determinó la presencia de estas cepas de bacterias dentro del tracto gastrointestinal de larvas de *Artemia*, su ubicación, condición de viabilidad celular y su ingesta activa o pasiva por *Artemia* en condición gnotobiótica mediante herramientas de microscopía de contraste de fases, microscopía electrónica de barrido, cortes histológicos, microscopía de fluorescencia y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Se determinó que las bacterias 8N y 8L fueron ingeridas de manera activa, se presentaron viables en mezcla con el alimento (levadura) sin atravesar la membrana peritrófica. Se evaluaron productos extracelulares de las bacterias 8N y 8L bajo electroforesis en gel de poliacrilamida con desnaturizante sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) y se determinó la presencia de proteasas; las endopeptidasas (no del tipo serino) de la cepa 8L mostraron una alta capacidad de digestión in vitro de proteínas de levadura por análisis de digestibilidad en pH-stat. Análisis por electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE), mostraron que la *Artemia* en condición agnotobiótica

tuvo la capacidad de bioencapsular ambas cepas 8N y 8L, y la bacteria 8N influyó en el perfil de la comunidad bacteriana del tracto digestivo. Larvas de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* de 24 días de edad en condiciones agnotobióticas mostraron similar ganancia de peso corporal y supervivencia con 8N y 8L bioencapsulada con *Artemia*, en comparación con el grupo control; sin embargo, la presencia de 8N significó un cambio en la comunidad bacteriana del tracto digestivo de la lubina. Además, ambas cepas no tuvieron capacidad de protección hacia al patógeno *Vibrio anguillarum* cepa 01b en pruebas de reto de 24 h. Con los resultados de la presente investigación, las cepas 8N y 8L pueden ser consideradas bacterias benéficas sin ser estrictamente probióticas. El modelo de cultivos gntobióticos de *Artemia* y los estudios polifásicos son sugeridos como estrategia para la investigación sobre las interacciones bacteria-huésped en estudios de ecología microbiana de ambientes acuícolas.

ABSTRACT

Bacteria that are administered in such a way as to enter the gastrointestinal tract and to be kept alive, with the aim of improving health, particularly providing protective capability against pathogens, are considered probiotics, however, for the evaluation of probiotic potential an essential quality is the antagonistic capability toward pathogens. Gnotobiotic studies have demonstrated the beneficial capability of a mix of *Exiguobacterium mexicanum* 8N DSM 16483^T and *Microbacterium* sp. 8L DSM 16485^T on the development and larval growth of *Artemia franciscana*, without affecting survival. This thesis determined the presence of these bacteria strains inside of gastrointestinal tract of *Artemia* larvae, their location, their viability, and their active or passive ingestion by *Artemia* in gnotobiotic condition, using phase contrast microscopy, scanning electron microscopy, histological techniques, fluorescence microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. The results showed that strains 8N and 8L were actively ingested, remained viable in a mix with food (yeast) and did not cross the peritrophic membrane. The extracellular products of the bacteria strains 8N and 8L were evaluated with SDS-PAGE and the presence and activity of proteases were determined in both strains. Non-serine endopeptidases of strain 8N showed a high digestive capability of yeast proteins by *in vitro* tests of pH-stat. Under agnotobiotic conditions, *Artemia* had the capacity of bioencapsulation with both strains. Temporal temperature gradient-gel electrophoresis showed the influence of 8N on the profile of the bacteria community in the digestive tract. Larvae of the European seabass *Dicentrarchus labrax*

in agnotobiotic condition at 24 days showed a similar improvement in body weight and survival with 8N and 8L bioencapsulated in *Artemia*, in comparison with the control group, but the presence of 8N changed the bacterial community of the digestive tract of lubina. Also, neither bacterial strain provided protective capability toward the pathogen *Vibrio anguillarum* strain 01b in challenge tests lasting 4 days. With these results, strains 8N and 8L could be considered as beneficial bacteria that support improvements without being showing strict probiotic functions. The model of gnotobiotic cultures of *Artemia* and polyphasic studies are suggested as a strategy in studying the interaction between bacteria and host in studies of microbial ecology of aquaculture environments.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis siempre queridos padres

MARÍA EUSEBIA MEDINA ESPINO, y TOMÁS

OROZCO HERNÁNDEZ;

y a mis hermanos TOMÁS, MARCELA, LINDA, y

MARIBEL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado con el registro No. 144761. El apoyo con el proyecto SEP-CONACYT 45914/A-1 “Diversidad microbiana: Fuente de innovación en biotecnología”, y el proyecto fiscal PC4.2 “Diversidad microbiana” otorgado al Dr. Alejandro López Cortés; al proyecto fiscal PC4.16 "Biología y cultivo de branquiópodos" otorgado al Dr. Alejandro M. Maeda Martínez, y a la línea estratégica EP4.0 “Maximización de valor económico de los productos de origen marino del noroeste de México” que coordina el Dr. Julio H. Córdova Murueta del programa de Ecología Pesquera del CIBNOR.

Al comité tutorial de mi tesis: Dr. Alejandro M. Maeda Martínez (Co-Director), Dr. Alejandro López Cortés (Co-Director), Dr. Julio H. Córdova Murueta (tutor), Dr. Dariel Tovar Ramírez (tutor), y Dr. Gopal Murugan (tutor). Al Dr. Jöel Gatesoupe, por recibirme para una estancia de investigación en su laboratorio en IFREMER en Brest, Francia.

Al personal del Posgrado del CIBNOR, José Manuel Melero, Horacio Sandoval, Osvelia Ibarra, Leticia González, Dra. Thelma Castellanos. Al Personal de biblioteca, Ana María Talamantes, Edgar Yuen Sánchez, y Ma. Esther Ojeda. A los técnicos responsables de los laboratorios del CIBNOR de histología e histoquímica Ma. Del Carmen Rodríguez J., de Microscopía electrónica de barrido Ariel Cruz V., Ecología Microbiana Molecular Ángel E. Carrillo G., de bioquímica Ma. De los Ángeles Navarrete del T., y al técnico Patrick Quazuguel del laboratorio UMR Nutrition, Aquaculture et Génomique del INRA-Ifremer en Brest, Francia. A Gerardo R. Hernández García, y Oscar Armendáriz R. del Depto. De Diseño Grafico y Fotografía.

A los amigos y amigas por el apoyo económico, material y moral en períodos difíciles durante el desarrollo de mi tesis. Agradezco especialmente al Dr. Alejandro M. Maeda Martínez por su permanente confianza y solidaridad.

Mi mas profundo agradecimiento a mis padres Tomás Orozco Hernández y María Eusebia Medina Espino, a mis hermanos Tomás, Marcela, Linda, y Maribel, por todo su cariño que me brindan, y su apoyo constante e incondicional.

Contenido

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS	i
CONFORMACIÓN DE COMITÉS	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	v
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	15
CAPITULO 1	16
Ingestión, localización, y viabilidad de las bacterias <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N y <i>Microbacterium</i> sp., 8L en el lumen intestinal de larvas de <i>Artemia franciscana</i> bajo condiciones de cultivo gnotobiótico	16
1.1. INTRODUCCIÓN	16
1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	18
1.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	18
1.2.2. Ingestión y localización de bacterias en el lumen intestinal	18
1.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del tracto intestinal de <i>Artemia</i>	21
1.2.4. Microscopía de luz del tracto intestinal de <i>Artemia</i>	22
1.2.5. Viabilidad de bacterias en el lumen intestinal de <i>Artemia</i>	22
1.2.6. Detección de cepas bacterianas por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	24
1.3. RESULTADOS.....	26
1.3.1. Ingestión bacteriana y localización	26
1.3.2. Viabilidad bacteriana	32

1.3.3. Detección molecular de cepas bacterianas por DGGE.....	33
1.4. DISCUSIÓN	36
1.4.1. Ingestión y viabilidad bacteriana en el lumen intestinal de <i>Artemia</i>	36
1.4.2. Localización de bacterias en lumen intestinal de <i>Artemia</i>	38
1.4.3. Vías de acción benéfica de bacterias.....	40
CAPÍTULO 2	42
Actividad y digestibilidad aparente de proteasas extracelulares de <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N <i>Microbacterium</i> sp., 8L sobre proteínas de levadura, determinado por SDS-PAGE y ensayos in-vitro por pH-stat multi-enzimático	42
2.1. INTRODUCCIÓN	42
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.2.1. Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (SPEs).....	44
2.2.2. Presencia y actividad de proteasas extracelulares	45
2.2.3. SDS-PAGE de las SPEs	46
2.2.4. Ensayos de digestibilidad in-vitro multienzimático por el método pH-Stat.....	47
2.2.5. SDS-PAGE de productos de digestión.....	48
2.2.6. SDS-PAGE-S de extracto enzimático de <i>Artemia</i> bajo cultivo gnotobiótico	49
2.3. RESULTADOS.....	50
2.3.1. Proteínas solubles y actividad de proteasas extracelulares	50
2.3.2. SDS-PAGE-sustrato de las SPEs	50
2.3.3. Digestión de proteínas de levadura con las SPEs por el método pH-stat.....	51
2.3.4. SDS-PAGE de productos de digestión con las SPEs de bacterias	51
2.3.5. SDS-PAGE-S de extracto enzimático de <i>Artemia</i> bajo cultivo gnotobiótico	53
2.4. DISCUSIÓN	56
2.4.1. Proteasas extracelulares de bacterias.....	56
2.4.2. <i>Microbacterium</i> sp., 8L.....	57
2.4.3. <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N	58

2.4.4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 588 CECT.....	59
2.4.5. Funciones benéficas de proteasas diferentes a la digestibilidad.....	61
2.4.6. Proteasas extracelulares bacterianas en el lumen intestinal de animales acuáticos.....	61
CAPÍTULO 3	66
Monitoreo de bacterias <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N y <i>Microbacterium</i> sp., 8L en el tracto intestinal larvario del crustáceo <i>Artemia franciscana</i>, y de lubina Europea <i>Dicentrarchus labrax</i> bajo condiciones de cultivo agnotobiótico, mediante la técnica de TTGE	66
3.1. INTRODUCCIÓN	66
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	68
3.2.1. Presencia y actividad de bacterias <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N y <i>Microbacterium</i> sp., 8L por detección y expresión del gen del 16S ARNr, en el lumen intestinal de larvas de <i>Artemia franciscana</i>, y su influencia en comunidad bacteriana determinada por TTGE	68
3.2.1.1. Condiciones de cultivo larval de <i>Artemia</i>	68
3.2.1.2. Concentración bacteriana cultivable aislada de lumen intestinal de <i>Artemia</i>	69
3.2.1.3. Extracción de ARN y ADN total presente en larvas de <i>Artemia</i>	70
3.2.1.4. Extracción de ADN de bacterias en cultivo axénico.....	74
3.2.1.5. RT-PCR de ARN extraído de larvas de <i>Artemia</i>	77
3.2.1.6. Amplificación del 16S ADNr de eubacterias en tracto intestinal de <i>Artemia</i>	77
3.2.1.7. Electroforesis en gel desnaturizante con temperatura temporal (TTGE)	79
3.2.2. Presencia y actividad de bacterias <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N y <i>Microbacterium</i> sp., 8L por detección y expresión del gen del 16S ARNr, en el lumen intestinal de larvas de lubina Europea <i>Dicentrarchus labrax</i>, y su influencia en la comunidad bacteriana determinada por el método de TTGE	80
3.2.2.1. Condiciones de cultivo larval de <i>D. labrax</i>	80
3.2.2.2. Extracción de ARN y ADN total presente en larvas de <i>D. labrax</i>	82
3.2.2.3. RT-PCR de ARN extraído de larvas de <i>D. labrax</i> de 24 días de post-eclosión (dpe) 82	
3.2.2.4. Amplificación del 16S ADNr de eubacterias en tracto intestinal de <i>D. labrax</i>	82
3.2.2.5. TTGE de bacterias en tracto digestivo de larvas de <i>D. labrax</i>	83

3.2.3. Efecto de la presencia del patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> 01b sobre la actividad de la comunidad bacteriana en lumen intestinal de <i>Dicentrarchus labrax</i> de 6 dpe con inclusión de <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N y <i>Microbacterium</i> sp., 8L.....	83
3.2.3.1. Condiciones de cultivo larval.....	83
3.2.3.2. Extracción, amplificación del 16Sr ADN y TTGE de larvas de 6 dpe en reto con bacterias <i>V. anguillarum</i> , 8N, y 8L.....	84
3.2.4. Efecto de la presencia del patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> 01b sobre la supervivencia y comunidad bacteriana intestinal de <i>Dicentrarchus labrax</i> de 16 dpe con inclusion de <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N y <i>Microbacterium</i> sp., 8L.....	85
3.2.4.1. Condiciones de cultivo larval de <i>D. labrax</i>	85
3.2.4.2. Extracción, amplificación del 16Sr ADN y TTGE de larvas de 16 dpe en reto con bacterias <i>V. anguillarum</i> , 8N, y 8L.....	85
3.3. RESULTADOS.....	86
3.3.1. Presencia y actividad de bacterias 8N y 8L en lumen intestinal de <i>Artemia</i>	86
3.3.2. Presencia y actividad de bacterias 8N y 8L en el lumen intestinal de larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i>	88
3.3.3. Actividad de las bacterias 8N y 8L en el lumen intestinal de <i>Dicentrarchus labrax</i> de 6 dpe expuesta a un reto con el patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> 01b.....	90
3.3.4. Presencia y actividad de las bacterias 8N y 8L en lumen de <i>Dicentrarchus labrax</i> de 16 dpe en reto con el patógeno <i>Vibrio anguillarum</i>	95
3.4. DISCUSION	96
3.4.1. Bacterias 8N y 8L en lumen intestinal de <i>Artemia</i>	96
3.4.2. Bacterias 8N y 8L en lumen intestinal de <i>Dicentrarchus labrax</i>	99
3.4.3. Bacterias 8N y 8L y su condición benéfica en cultivos agnotobióticos.....	103
4. PERSPECTIVAS GENERALES	106
5. LITERATURA CITADA.....	109
APÉNDICE A.....	121
PROTOCOLOS TÉCNICOS	121
P1. Extracción de ácidos nucleicos bacterianos a partir de larvas de <i>Artemia</i>	121

P2. Procedimiento técnico para la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizante (DGGE).....	125
APÉNDICE B.	140
PRIMER ARTÍCULO	140
APÉNDICE C.	141
SEGUNDO ARTÍCULO	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del diseño experimental de los cultivos gnotobióticos de <i>Artemia</i>	20
Figura 2. Diagrama de flujo para la tinción de bacterias en tracto digestivo de larvas de <i>Artemia</i> con el fluorocromo LIVE/DEAD® BacLight™.....	24
Figura 3. Micrografías de secciones media sagital de larvas de <i>Artemia</i> bajo pruebas de ingestión y localización de <i>Exiguobacterium mexicanum</i> cepa 8N.....	29
Figura 4. Micrografías de secciones media sagital de larvas de <i>Artemia</i> bajo pruebas de ingestión y localización de <i>Microbacterium</i> sp., cepa 8L.	31
Figura 5. Microfotografías de larvas de <i>Artemia</i> bajo pruebas de viabilidad de <i>Exiguobacterium mexicanum</i> cepa 8N en lumen intestinal con fluorocromos LIVE/DEAD® BacLight™.	33
Figura 6. Microfotografías de larvas de <i>Artemia</i> bajo pruebas de viabilidad de <i>Microbacterium</i> sp. cepa 8L en lumen intestinal con fluorocromos LIVE/DEAD® BacLight™.....	34
Figura 7. DGGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias en cultivos puros y de bacterias presentes en el lumen intestinal de <i>Artemia</i>	35

Figura 8. Diagrama de flujo para la extracción de sustancias poliméricas extracelulares de bacterias en medio de cultivo líquido 2216.	45
Figura 9. Zimogramas con caseína como sustrato, de las sustancias poliméricas extracelulares (SPEs) de las cepas bacterianas <i>Microbacterium</i> sp. 8L, <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N.	53
Figura 10. Patrón de proteínas en geles de SDS-PAGE, con carga de proteína de levadura incubada con SPEs de las bacterias <i>Microbacterium</i> sp. 8L, <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N, <i>Microbacterium</i> sp. 8R, y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (VP), a través del tiempo de digestibilidad <i>in vitro</i> en pH-Stat.	54
Figura 11. Zimogramas con sustrato caseína, muestra los extractos enzimáticos de larvas de <i>Artemia</i> obtenidas bajo cultivo gnotobiótico expuesta a la bacteria <i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N.	55
Figura 12. Diagrama de flujo para la extracción de ARNt de bacterias en tracto digestivo de larvas de <i>Artemia franciscana</i> y <i>Dicentrarchus labrax</i> por el método de Trizol™.	72
Figura 13. Diagrama de flujo para la extracción de ADN de bacterias en tracto digestivo de larvas de <i>Artemia franciscana</i> y <i>Dicentrarchus labrax</i>	75
Figura 14. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias presentes en el lumen intestinal de <i>Artemia</i> nauplio expuesta 24 h a las cepas bacterianas 8N y 8L a concentraciones de 10^7 bacteria mL^{-1} , y 10^8 bacterias mL^{-1}	89
Figura 15. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias obtenidas por amplificación de ADN genómico (PCR) y ADN complementario (RT-PCR), a partir de ADN y ARN extraído de lumen intestinal de larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> a 19 días de cultivo (24 dpe).	91
Figura 16. Peso y supervivencia de larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> a los 19 días de cultivo (24 dpe).	92
Figura 17. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias obtenidas por amplificación de ADN complementario (RT-PCR), a partir ARN extraído de lumen	

intestinal de larvas de *Dicentrarchus labrax* con 6 días de post-eclosión (dpe) de edad expuestas a *Vibrio anguillarum* 01b durante 24 h. 93

Figura 18. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias obtenidas por amplificación de ADN genómico (PCR) y ADN complementario (RT-PCR), a partir de ADN y ARN extraído de lumen intestinal de larvas de *Dicentrarchus labrax* con 11 días de cultivo (16 dpe) de los tratamientos C, L, y N, y posteriormente expuestas a *Vibrio anguillarum* 01b durante 4 días sin alimentación. 94

Figura 19. Supervivencia de larvas de *Dicentrarchus labrax* con 16 días de post-eclosión de edad expuestas al patógeno *Vibrio anguillarum* 01b durante 4 días. 96

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Conteo de bacterias presentes en el agua de cultivo de *Artemia*, bajo experimentos de Prueba I. 28

Tabla II. Concentración de bacterias y contenido de proteínas en el extracto de sustancias poliméricas extracelulares (SPEs); su actividad enzimática en azocaseína, y grado de hidrólisis (GH%) sobre la proteína de levadura. 52

Tabla III. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación (PCR) parcial del gen 16S ribosomal de eubacterias en larvas agnotobióticas de *Artemia* y *D. labrax*. 78

Tabla IV. Cuenta bacteriana en lumen intestinal de nauplios de *Artemia* a 24 h de cultivo agnotobiótico en base a medios de cultivo PetriFilm™ y medio selectivo. 87

Tabla V. Análisis de similitudes por el índice de DICE de las comunidades bacterianas desarrolladas en cultivos agnotobióticos de *Artemia* comparando tratamiento control con los demás tratamientos, en base a la presencia de ácidos nucleicos genómico (16S ADNr) y complementario (16S ARNr) extraídos de los nauplios de *Artemia*, indicadores de presencia y de actividad bacteriana, respectivamente. 88

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las primeras atribuciones benéficas reportadas de bacterias hacia el mejoramiento de la salud de organismos acuicultivados fueron las de ejercer una protección hacia bacterias y virus patógenos, determinadas por pruebas *in vitro* (Dopazo et al., 1988). Estudios sobre la protección bacteriana contra patógenos en la interacción huésped-bacteria han predominado en las evaluaciones posteriores de bacterias para determinar su estatus probiótico en acuicultura (Gómez-Gil et al., 2000; Vershuere et al., 2000b; Gullian et al., 2004). Las definiciones propuestas para el concepto probiótico en acuicultura como la definida por Gatesoupe (1999), quien sugiere que los probióticos son aquellas células microbianas que son administradas de tal manera que entran al tracto gastrointestinal y se mantienen vivas, con la meta de mejorar la salud del organismo; y el concepto de probiótico definido por Verschuere et al. (2000b) en el que enunciaron como un microorganismo vivo adjunto el cual tiene un efecto benéfico sobre el huésped mediante la modificación de la comunidad bacteriana ambiental o asociada al huésped, por el aseguramiento del uso mejorado del alimento o aumentando su valor nutricional, por el incremento de la respuesta del huésped hacia enfermedades, o por el mejoramiento de la calidad de su medio ambiente. Estos conceptos son tan amplios que las bacterias putativas probióticas pueden ejercer formas de acción benéfica distintas, y la falta del atributo protector contra patógenos no necesariamente es motivo de exclusión de la categoría probiótica, en el sentido estricto de la definición. Sin embargo, Gómez-Gil et al. (2000) afirmó que debe existir una clara distinción entre la función probiótica de una bacteria con la de un microorganismo que solo suministra nutrientes esenciales como complemento alimenticio. Vine et al. (2006) incluye que en larvicultura marina para

seleccionar un organismo probiótico, además de la capacidad protectora hacia patógenos, la bacteria debe tener la capacidad de crecimiento en el mucus intestinal y de producir otros compuestos benéficos.

Revisiones sobre probióticos en acuicultura muestran trabajos de investigación con una amplia gama de funciones (comprobadas, sugeridas y potenciales) benéficas que las bacterias ofrecieron a la salud de sus huéspedes (Balcázar et al., 2006; Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil et al., 2000; Tinh et al., 2008; Verschuere et al., 2000b; Vine et al., 2006), y algunos investigadores han dado directrices para calificar o identificar a microorganismos que podrían pertenecer a este grupo, de entre las principales se mencionan que un probiótico debe presentar las siguientes características biológicas: Gatesoupe (1999) menciona que debe ser antagónico a patógenos con colonización intestinal (adhesión al mucus intestinal), y conferir resistencia incrementada del huésped hacia patógenos. Verschuere et al. (2000), mencionaron que los probióticos deben presentar un antagonismo a patógenos, colonización y adhesión, viabilidad dentro del huésped o de su ambiente de cultivo (*in vitro* o *in vivo*), y deben ser estudiados a través de pruebas *in vivo* con cultivos monoxénicos determinando el desempeño del huésped (supervivencia, comportamiento natatorio o de alimentación), evaluando la no patogenicidad y el efecto probiótico hacia el huésped. Vine et al. (2006) consideraron importante estudiar el antagonismo hacia patógenos, evaluar la no patogenicidad del probiótico, evaluar el probiótico *in vivo* sobre un probable mejoramiento en supervivencia y crecimiento, la producción de compuestos antagónicos a patógenos, características de crecimiento poblacional ventajoso, capacidad de adhesión a mucus intestinal, y producción de otros compuestos benéficos para el huésped además del efecto protector a patógenos. Balcázar et al. (2006)

enunciaron que es importante presentar una exclusión competitiva a bacterias patógenas, prueba de histopatología hacia el huésped, capacidad de colonización y/o adhesión, y producción de compuestos antagónicos a patógenos.

En base a las revisiones anteriores sobre el concepto de probióticos en acuicultura, parece que éste incluye como indispensable el poseer una atribución de protección hacia potenciales patógenos mediante su tránsito viable o mediante el establecimiento a lo largo del canal digestivo del huésped (Balcázar et al., 2006; Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil et al., 2000; Verschueren et al., 2000b; Vine et al., 2006).

El uso de probióticos en la acuicultura está ampliamente extendido principalmente en el cultivo de larvas de algunas especies de peces y crustáceos marinos (Decam et al., 2008; Vine et al., 2006). Hoy en día una alta proporción de productos denominados probióticos que se utilizan en acuicultivos de organismos marinos ofrecen resultados con un sustento científico débil (Tinh et al., 2008). Así mismo, en general continúa sin conocerse los mecanismos precisos de la forma en que las bacterias ejercen un beneficio (Irianto y Austin 2002; Tinh et al., 2008). No obstante, el impacto de la comunidad bacteriana en el tracto digestivo de organismos acuicultivados ha demostrado ser importante en su desarrollo fisiológico, así como en el sistema inmune y el metabolismo de su huésped. Un estudio con juveniles del pez cebra *Danio rerio* en condición gnotobiótica revelaron que la microbiota convencionalizada y convencionalmente cultivada reguló la expresión de 212 genes del tracto digestivo y 59 genes conservados que son homólogos en intestino de ratones modelo gnotobióticos, incluyendo las relacionadas a la estimulación de la proliferación epitelial, en la promoción del metabolismo de nutrientes, y en la respuesta inmune innata, mediante evaluaciones de ADN en sistemas de microarreglos (Raws et al., 2004).

Las cepas 8N y 8L fueron recuperadas de la superficie de quistes comerciales de *Artemia* mediante cultivos en condición estéril, lo cual indica su probable pertenencia a especies autóctonas de la comunidad microbiana presente en el hábitat natural de este branquiópodo, el lago salino de la Bahía de San Francisco, E.U.A. (Orozco-Medina et al., 2002). Se han hecho esfuerzos por recuperar especies de bacterias autóctonas o que predominan en organismos saludables con potencial probiótico para aplicarlos en acuicultura, no obstante la diversidad microbiana presente en estos ambientes la mayoría de los estudios se han reducido a grupos de bacterias Vibrionaceas, Salmonedaceas, *Bacillus* spp., y bacterias ácido lácticas (Irianto y Austin 2002; Gatesoupe 1999, Vine et al., 2006), este último grupo introducido en larvas de peces marinos con resultados prometedores pero escasamente representados en aislamientos de ambientes naturales del tracto digestivo de estos peces (Vine et al., 2006).

Orozco-Medina et al. (2002) reportaron por primera vez a los géneros *Exiguobacterium* y *Microbacterium* como bacterias benéficas en el desarrollo y crecimiento larvario de *Artemia* en sistemas de cultivo gnotobiótico, sin detrimento en su supervivencia, y fue también el primer reporte para organismos acuicultivados en general. Solo una cepa del genero *Microbacterium* sp., ha sido aislada de entre una comunidad bacteriana desarrollada de manera fortuita en el tracto gastrointestinal de la trucha ártica *Salvelinus alpinus*, y se le menciona como miembro participante en una probable contribución a procesos nutricionales (Ringo et al., 1995). Con este marco teórico de referencia sobre el probable tipo de participación benéfica de estos géneros entre huésped-bacteria, se determinó hacer estudios *in vivo* bajo cultivos gnotobióticos larvales de *Artemia*, sobre la capacidad de ingesta por *Artemia* sobre estas bacterias 8N y 8L, su probable establecimiento y distribución en el lumen intestinal, y la viabilidad

celular en el ambiente luminal. Posteriormente se evaluaron las cepas 8N y 8L en condiciones de cultivo agnotobiótica con larvas de *Artemia*, determinando la carga intestinal bacteriana, la relación de presencia y actividad celular en el tracto digestivo de *Artemia*, y la influencia que tiene en la estructura de la comunidad bacteriana desarrollada de manera fortuita. De igual forma se evaluaron estas cepas 8N y 8L con larvas de *Dicentrarchus labrax* determinando la relación de presencia y actividad celular en el tracto digestivo, y su influencia en la estructura de la comunidad bacteriana, además de la determinación de supervivencia y peso total al final de un cultivo de 19 días con peces de una edad de 6 dpe. Una prueba *in vivo* de protección contra el patógeno *Vibrio anguillarum* 01b fue realizada en larvas de 6 dpe. Como uno de los probables modos de acción benéfica nutricional de las cepas 8N y 8L hacia larvas de *Artemia*, se estudió aplicando el método de pH-stat la producción de proteasas celulares y su capacidad de hidrólisis sobre las proteínas del alimento, en este caso la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo a lo arriba discutido sobre el concepto probiótico, y a los resultados en pruebas de antagonismo hacia bacterias patógenas por parte de las bacterias putativas probióticas de *Exiguobacterium mexicanum* DSM16483^T y *Microbacterium* sp. 8L DSM16485^T, estas bacterias no podrían ser catalogadas como probióticos para larvas de *Artemia* y de peces marinos, sin embargo pueden ser consideradas como unas bacterias benéficas en el desarrollo larval de *Artemia* (Orozco-Medina et al., 2002), y bacterias sin detrimento en la supervivencia y peso corporal en larvas de peces *Dicentrarchus labrax* (datos reportados en la presente tesis). Y como una posible vía de beneficio bacteriano se propone el aporte de enzimas proteasas extracelulares que apoyan en la

digestión del alimento del huésped *Artemia*, particularmente con la bacteria *Microbacterium* sp. cepa 8L.

JUSTIFICACIÓN

En organismos acuicultivados, es importante la comprensión de los modos de interacción entre huésped y bacteria a nivel del tracto gastrointestinal, en los cuales el suministro de células bacterianas viable (o potencialmente viable) en el agua de cultivo o el alimento ha resultado en el mejoramiento del desarrollo y salud del hospedero. Para lo cual se requieren estudios a nivel de población microbiana que resuelvan las preguntas básicas de su ingesta, viabilidad, actividad, ubicación, persistencia, e inocuidad en el lumen intestinal del organismo bajo cultivo. Esta información es considerada un apoyo para la determinación de estudios directrices a niveles de organización más específicos, que nos permitan conocer los modos de acción benéfica ejercidos por las bacterias en cuestión.

HIPÓTESIS

Se estimó que los probables modos de acción benéficos de las bacterias *E. mexicanum* cepa 8N y *Microbacterium* sp., cepa 8L, en el desarrollo de larvas de *Artemia*, se llevan a cabo dentro del tracto gastrointestinal, por lo se establecieron las siguientes hipótesis.

1. Las bacterias *Microbacterium* sp. 8L y *Exiguobacterium mexicanum* 8N son ingeridas por las larvas de *Artemia franciscana* y se establecen o transitan viables en el tracto gastrointestinal, además, no invaden o dañan el epitelio intestinal.
2. Las enzimas proteasas extracelulares de las bacterias *Microbacterium* sp. 8L y *Exiguobacterium mexicanum* 8N apoyan en la digestión inicial de levadura usado como alimento para *Artemia franciscana*, actuando en el lumen intestinal en mezcla con el quimo.
3. Las bacterias *Microbacterium* sp. 8L y *Exiguobacterium mexicanum* 8N en cultivos agnotobióticos de larvas de *Artemia franciscana* y de la lubina *Dicentrarchus labrax*, son ingeridas y se encuentran en estado celular activo (además de viables) en el tracto gastrointestinal, y ejercen una protección hacia el patógeno *Vibrio anguillarum* 01b, además de influir en la diversidad de la comunidad bacteriana del tracto digestivo de dichas larvas.

OBJETIVOS

Las bacterias *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp. 8L son reportadas benéficas por primera vez como género y como especie en organismos acuicultivados en la especie *Artemia franciscana*. Por lo tanto, para conocer más acerca de los modos de acción benéfica nos planteamos los siguientes objetivos particulares

1. Estudiar la ingestión, localización, establecimiento, y condición de viabilidad de las cepas 8N y 8L en el tracto digestivo de larvas de *Artemia*, en cultivos gnotobióticos.
2. Determinar la producción de enzimas proteasas extracelulares por estas bacterias y su capacidad de hidrólisis de proteínas de levadura usada como alimento para la *Artemia* bajo condiciones de cultivo gnotobiótico.
3. Monitorear la presencia y actividad bacteriana mediante indicadores moleculares de las poblaciones de bacterias benéficas 8N y 8L, y el perfil de la comunidad bacteriana fortuita en el tracto digestivo de larvas de *Artemia franciscana*, y de *Dicentrarchus labrax*, en cultivos agnotobióticos, con una prueba *in vivo* de protección contra un patógeno en esta última especie.

CAPITULO 1

Ingestión, localización, y viabilidad de las bacterias *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp., 8L en el lumen intestinal de larvas de *Artemia franciscana* bajo condiciones de cultivo gnotobiótico

1.1. INTRODUCCIÓN

Las comunidades bacterianas en cultivos de *Artemia* son estudiadas principalmente para mejorar la supervivencia larval y el desarrollo, e incrementar la resistencia a enfermedades (Makridis et al., 2000; Marques et al., 2006; Verschuere et al., 1999; Verschuere et al., 2000). Harris (1993) revisó los tipos de interacciones entre los invertebrados acuáticos y los microbios, y enfatizó que las comunidades de bacterias en el intestino requieren de una evaluación rigurosa a nivel de poblaciones. De acuerdo a Gatesoupe (1999), los microorganismos benéficos (probióticos) son considerados para funcionar a través del antagonismo contra patógenos, de la colonización intestinal (con posible adhesión al mucus intestinal), e incrementar la resistencia del huésped hacia los patógenos. Algunos investigadores han propuesto que los efectos benéficos de las bacterias en *Artemia* son el resultado de la contribución nutricional de suplementos, o de la competencia mediante la exclusión de bacterias patógenas (Gorospe et al., 1996; Irianto y Austin, 2002; Marques et al., 2005). Marques et al. (2006) propusieron el uso de sistemas gnotobióticos como una herramienta estándar para las investigaciones sobre las interacciones entre los animales acuáticos y los microorganismos. Varios métodos

de cultivo para la producción de *Artemia* bajo condiciones gnotobióticas han sido publicados (Marques et al., 2006; Hernandorena, 1991; Orozco-Medina et al., 2002)

Las bacterias heterotróficas Gram-positivas aeróbicas *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N (López-Cortés et al., 2006) y *Microbacterium* sp., cepa 8L en cultivos dixénicos con *Artemia* resultaron con efecto benéfico en el desarrollo y el crecimiento larval (Orozco-Medina et al., 2002). Un modo probable de acción de estas bacterias para proveer de efecto benéfico para la *Artemia* puede ser a nivel del tracto intestinal; no obstante, no hay estudios sobre la interacción de estas en particular en el lumen intestinal de *Artemia*. Ha sido ampliamente aceptado que el crustáceo *Artemia* se alimenta como un filtrador no selectivo (Marques et al., 2006; Sorgeloos et al., 2001). Sin embargo, un estudio sobre la selectividad de alimento en este camarón salmuera demostró la importancia del tamaño de partícula en el proceso de filtración en diferentes etapas de desarrollo (Gelabert, 2001). Gómez-Gil et al. (1998) reportaron que la ingestión de bacterias depende considerablemente del tipo de bacteria, el tiempo de exposición, y el estatus (viva o muerta) de la bacteria. Así entonces, la meta de este estudio fue investigar la interacción entre *E. mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp. 8L, y el lumen intestinal de *A. franciscana* en cultivos gnotobióticos, con y sin levadura de pan comercial autoclaveada como alimento, y determinar si estas bacterias mantenían su viabilidad dentro del tracto intestinal. El enfoque fue sobre las siguientes preguntas: ¿Son estas cepas bacterianas ingeridas? Si es así, ¿En donde se localizan dentro del tracto intestinal? Y ¿Estas bacterias se encuentran vivas o muertas dentro del tracto intestinal?

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Exiguobacterium sp., cepa 8N y *Microbacterium* sp., cepa 8L fueron aisladas de quistes de *Artemia franciscana* (Orozco-Medina et al., 2002) y preservadas con 5 % (v/v) de glicerol en caldo marino 2216 (DIFCO Corp.) a -196 °C en nitrógeno líquido. La identidad de la cepa 8N correspondió a una nueva especie denominada *Exiguobacterium mexicanum*, depositada en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ) con la clave de cepa tipo DSM 16483^T (López-Cortés et al., 2006), *Microbacterium* sp. La cepa 8L fue registrada con la clave DSM 16485^T (en espera de su alta en la colección del DSMZ cuando su utilización sea mencionada en publicación científica indexada). Las cepas fueron cultivadas en caldo marino 2216 a 30 °C, con agitación a 120 rpm y cosechadas en la fase de crecimiento exponencial (Orozco-Medina et al., 2002). Las células bacterianas fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación a 6000 × g por 5 min a 25 °C, y suspendidas en 20 mL de agua de mar artificial estéril (AMAE, Instant Ocean[®], 35 g L⁻¹), para utilizar como fuente de inóculo.

1.2.2. Ingestión y localización de bacterias en el lumen intestinal

Se realizó la Prueba I con duración de 24 h, y comprendió los siguientes tratamientos: IA, *Artemia* axénica; IB, *Artemia* monoxénica con las bacterias *E. mexicanum* 8N, o *Microbacterium* sp. 8L; y IC, *Artemia* monoxénica con las bacterias 8N, u 8L mas 0.05 g L⁻¹ de células muertas (esterilizadas por autoclave) de levadura de pan comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Nevada SAF-MEX, México) como alimento. Los

tratamientos se realizaron por duplicado usando 40 nauplios de *Artemia* libres de bacterias cada uno, cultivados en tubos de ensayo que contenían 40 mL de AMAE, esterilizada por autoclave y filtrada con filtro Whatman 7182-004 de 0.2 μm de diámetro de poro; los cultivos se mantuvieron a 28 °C en un baño maría. Todos los experimentos se realizaron con dos repeticiones (ver diagrama en Figura 1). En los tratamientos con bacteria, cada tubo de ensayo fue inoculado a una densidad final de 1×10^6 células mL^{-1} de cada cepa bacteriana. El volumen de inóculo en cada tubo fue calculado con la fórmula $V_2 = (C_1) (V_1)/C_2$, donde V_2 es el volumen a inocular, C_1 es la concentración celular (1×10^6 células mL^{-1}), V_1 es el volumen de AMAE en cada tubo (40 mL), y C_2 es la concentración celular en la fuente de inóculo determinado por tres conteos totales con una cámara Petroff-Hausser.

Los nauplios de *Artemia* libre de bacterias fueron obtenidos con el método descrito por Orozco-Medina et al. (2002). Los quistes fueron descapsulados (eliminación del corion) con hipoclorito de sodio e incubados en AMAE. Las soluciones de hidratación y de descapsulación de quistes fueron preparadas con agua destilada. Los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar y la cristalería utilizada fue esterilizada por autoclave a 120 °C por 20 min. Al inicio de los cultivos experimentales, los nauplios de *Artemia*, la levadura, y el inóculo bacteriano (dado el caso) fueron introducidos dentro de los tubos de ensayo en el orden mencionado con el AMAE previamente adicionada. Para mantener la levadura en suspensión en el medio de cultivo de *Artemia*, los tubos experimentales fueron

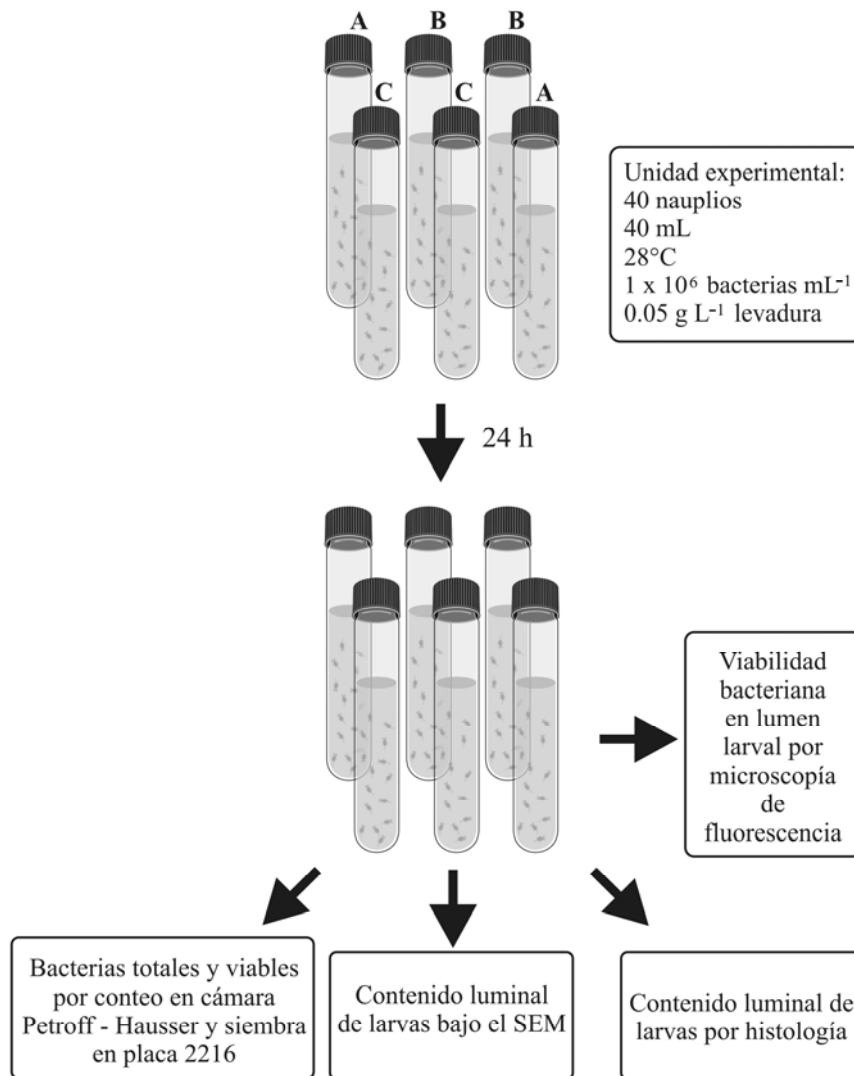


Figura 1. Diagrama de flujo del diseño experimental de los cultivos gnotobióticos de *Artemia*. A = tratamiento A, larvas de *Artemia* axénicas, B = tratamiento B, larvas monoxénicas con la cepa bacteriana 8N u 8L, C = tratamiento C, larvas monoxénicas con levadura esterilizada por autoclave como alimento.

gentilmente agitados durante 1 min cada 8 h. La determinación de bacterias en el agua de cultivo de *Artemia* fue mediante la cuenta total (células mL⁻¹) con una cámara Petroff-Hausser bajo un microscopio óptico de contraste de fases Nikon Labophot, y por

conteo de bacterias viables (UFC mL⁻¹) en placas con agar marino 2216 (Difco Corp.). Las determinaciones fueron hechas a las 0 h y 24 h de cultivo. Los resultados de cuentas bacterianas fueron analizados por ANOVA de una vía, y por pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey (Sokal y Rohlf, 1995) usando el programa Statistica™ versión 6.0.

1.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del tracto intestinal de *Artemia*

La localización de bacterias en el tracto intestinal de *Artemia* fue determinado por SEM. Larvas de cultivos axénicos y monoxénicos fueron procesadas según Felgenhauer (1987), con algunas modificaciones. Las larvas fueron fijadas en una solución de 200 µL de glutaraldehído al 2.5 % en 0.1 M de cacodilato de sodio, y 3.5 % de sal marina artificial Instant Ocean®, con tres cambios de solución cada hora e incubadas a 4 °C. Pevio a la fijación, las larvas vivas fueron anestesiadas por inmersión en una solución de cloroformo-AMAE a una proporción 1:100 durante 30 segundos para prevenir la excreción fecal durante el proceso de fijación. Las larvas fueron lavadas posteriormente tres veces con 500 µL de AMAE a 25 °C por 10 min en cada lavado. La post-fijación fue hecha con 2 % de OsO₄ disuelto en agua (SIGMA) durante 8 h a 4 °C, bajo protección contra la luz. Luego, las muestras fueron lavadas tres veces con 1000 µL de agua destilada estéril durante 30 min cada lavado. El proceso de deshidratación gradual fue con acetona en agua destilada a 10 %, 20 %, 30 %, 45 %, 65 %, 80 %, 90 %, y 100 %, a 25 °C, tres veces expuestas en cada concentración durante 5 min. El secado a punto crítico de los especímenes fue realizado con CO₂ en el desecador Samdri-PUT-3B, a 33.4 °C por 30 min. Las larvas desecadas fueron seccionadas en cortes sagitales con

navaja de afeitar estéril, para exponer el contenido del lumen intestinal de *Artemia*. Las larvas seccionadas fueron montadas en bases de aluminio con adhesivo EMS77100, y posteriormente recubiertas con Paladio dentro de una cámara evaporadora de metales con vacío Denton DESK II a 45 mA por 35 segundos. Las muestras fueron analizadas bajo un microscopio electrónico de barrido HITACHI S3000-N, a un voltaje de aceleración de 5 a 20 kV.

1.2.4. Microscopía de luz del tracto intestinal de *Artemia*

La localización de bacterias dentro del tracto intestinal de *Artemia* fue estudiada también utilizando un microscopio de luz óptico. Las larvas de cultivos experimentales fueron fijadas en solución de Davidson al 100 % (Bell y Lighter, 1988) por 24 h, después fueron inmersas en etanol al 70 % 24 h. Las larvas fijadas fueron entonces deshidratadas gradualmente en etanol al 80 %, 90 %, 96 %, y 100 %, por 30 min en cada concentración, para luego ser inmersas en parafina, seccionadas (4 µm), y teñidas con Hematoxilina-Eosina según los procedimientos estándar (Sheehan y Hrapchak, 1973). Finalmente, las muestras fueron embebidas en resina poliéster monómero-estireno Entellan® (Merck 1.07960), y observadas bajo un microscopio de contraste de fases Olympus BX41.

1.2.5. Viabilidad de bacterias en el lumen intestinal de *Artemia*

Los experimentos denominados Prueba II, con duración de 24 h, comprendieron los mismos tratamientos descritos en Prueba I, asignados aquí como tratamientos IIA, IIB,

y IIC, con dos repeticiones. Las observaciones se llevaron cabo por microscopía de fluorescencia, para estudiar la ingestión y viabilidad de las bacterias en el lumen intestinal de *Artemia*. Para demostrar la ausencia de autofluorescencia se incluyó el tratamiento IID que consistió de cultivos axénicos de *Artemia* con levadura esterilizada por autoclave. Para el análisis, muestras de agua fueron tomadas a las 0 h (*Artemia* en etapa nauplio) y a las 24 h de cada tratamiento; también, cinco larvas fueron removidas y suspendidas vivas en 500 μ L del mismo medio de cultivo larval. Posteriormente, se añadió 30 μ L de solución al 100 % de cada fluorocromo SYTO 9 y Ioduro de propidio, preparado como lo recomiendan en el producto comercial LIVE/DEAD[®] BacLight[™] bacterial viability kit L13152. El fluorocromo SYTO 9 produce un color verde fluorescente en las células de bacterias vivas (a una longitud de excitación-emisión de 480-500 nm) y el ioduro de propidio produce un color rojo fluorescente en las células bacterianas muertas (a 490-635 nm). La suspensión de *Artemia* en medio de cultivo con solución de tinción, fue incubada por 30 min a 25 °C en la oscuridad; luego, las larvas fueron anestesiadas con 10 μ L de eugenol al 10 % por 15 min para evitar la excreción del contenido intestinal. Las larvas teñidas fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 con un filtro U-MD/F/TXRD 470-490 nm, usando una lámpara de mercurio de 50 watts como fuente de luz (ver diagrama en Figura 2). Las micrografías fueron obtenidas usando una cámara digital CoolSNAP-Pro Media Cybernetics y editadas con el programa Image-Pro Plus 4.5.0.1.9.

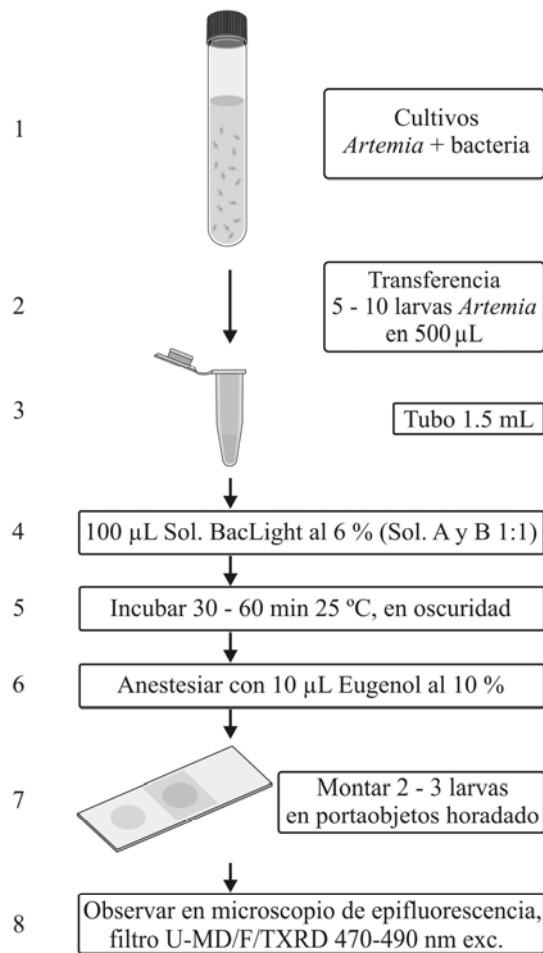


Figura 2. Diagrama de flujo para la tinción de bacterias en tracto digestivo de larvas de *Artemia* con el fluorocromo LIVE/DEAD[®] BacLight[™].

1.2.6. Detección de cepas bacterianas por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La Prueba III consistió de cultivos de nauplios axénicos de *Artemia* de 24 h para obtener larvas en etapa metanauplio I. En esta etapa de desarrollo se inicia la filtración e ingestión de partículas de alimento (Schrehardt, 1987). Así, los metanauplios I fueron usados para determinar la ingesta de bacterias bajo dos condiciones de actividad

natatoria: activa y pasiva. En la condición activa la larva nada, filtra y se alimenta. Para obtener larvas en condición pasiva los metanauplios fueron anestesiados con una solución de cloroformo-AMAE de 1:100 durante 30 segundos. Las larvas, activas y pasivas, fueron retadas en condición monoxénica y dixénica con las cepas 8N y 8L. La Prueba III fue diseñada para estudiar si la bacteria logra ingresar al tracto intestinal en condición pasiva y corroborar el ingreso de las bacterias en condición activa. Los tratamientos fueron los siguientes: Tratamiento control, metanauplios axénicos en condición activa sin exposición a bacterias; tres tratamientos en condición activa y pasiva de los cultivos monoxénicos con 8N y 8L, y el cultivo dixénico con la mezcla de ambas cepas bacterianas. La exposición de metanauplios I a las bacterias fue hecha por inmersión en AMAE con bacterias a una concentración de 1×10^6 células mL⁻¹ de cada cepa, durante 1 h. La inactivación de las larvas fue por anestesia con solución de cloroformo al 0.25 % por 1 h. El análisis de DGGE de cada tratamiento se realizó con 160 *Artemias* metanauplio I, distribuidas en cuatro tubos de ensayo con 40 larvas cada uno. Este experimento fue repetido cuatro veces. En todos los tratamientos, las bacterias en superficie externa fueron eliminadas por inmersión de las larvas durante 30 segundos en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (concentración final 0.06 % de cloro activo) preparado con AMAE. Las larvas fueron lavadas tres veces en 15 mL de AMAE y posteriormente en 0.05 % de solución surfactante (Tween 80, SIGMA P4780, disuelto en AMAE) y finalmente lavadas tres veces en AMAE. Para corroborar la eliminación de bacterias externas, diez larvas completas y diez larvas homogenizadas fueron colocadas por separado en placas con agar marino 2216 (Difco, Corp.) en tres repeticiones e incubadas al menos 72 h a 30 °C. El ADN total fue extraído (Nübel et al., 1997; ver Apéndice A, P1) de tres tipos de muestras: (1) De cultivos puros de bacterias,

para los indicadores control, (2) de larvas axénicas en cultivo, y (3) de larvas expuestas a las bacterias. Un fragmento del gen que codifica para el 16S del ARN ribosomal, fue amplificado por PCR (Saiki et al., 1988) usando los iniciadores 341F y 907R, los cuales son universales para eubacterias (Muyzer et al., 1998). Una cola de GC fue unida al iniciador 341F en la posición 5'. La secuencia del iniciador con la cola GC-341F fue 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', y la secuencia del iniciador 907R fue 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' (Muyzer et al., 1998). Las condiciones del PCR fueron, una etapa inicial desnaturante de 5 min a 95 °C, 35 ciclos consecutivos consistiendo de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C, y 1 min a 72 °C, y un ciclo final de 5 min a 72 °C. Las secuencias parciales del 16S de las bacterias ingeridas por la *Artemia* fueron detectadas por DGGE, el cual fue llevado a cabo en gel de poliacrilamida al 6 % con gradiente de 30 a 70 % de desnaturante de urea al 7 M y 40 % de formamida (ver Apéndice A, P2). Las bandas de ADN fueron observadas en geles teñidos con plata (Tebbe et al., 2001; ver anexo A, P3) después de la electroforesis a 50 V y 60 °C durante 15 h (Muyzer et al., 1993).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Ingestión bacteriana y localización

El agua de cultivo de *Artemia* del tratamiento IA se mantuvo en condiciones axénicas durante las 24 h de incubación, tal como es demostrado por la ausencia de bacterias en los conteos bacterianos viables y totales (Tabla I). Los tratamientos con bacteria IB y IC

iniciaron con conteos viables cercanos de 1×10^6 células mL^{-1} ($P > 0.05$) en el agua de cultivo de *Artemia*. Las comparaciones entre los conteos viables y totales de ambas cepas bacterianas 8N y 8L después de 24 h de cultivo, en los tratamientos IB y IC indicaron que las bacterias suspendidas se mantuvieron viables ($P > 0.05$). En el tratamiento IC, un incremento significativo en el número total y cuenta viable de 8L ($P > 0.05$) fue observado en cultivos de *Artemia* después de 24 h; pero con la cepa 8N el incremento significativo fue solo evidente en el número de células viables (Tabla I). Al comienzo de todos los experimentos (IA, IB, IC), las larvas de *Artemia* mostraron el lumen intestinal vacío con microvellosidades en la zona apical del epitelio sugiriendo la capacidad de alimentación de una fuente externa, sin embargo no fueron observadas bacterias (Figura 3A, 3A). Las larvas de todos los tratamientos después de 24 h de cultivo mostraron las tres regiones del tracto alimentario: El estomodeo o esófago (Figura 3B), el mesenteron o intestino medio, y el proctodeo o intestino anterior (Figura 3C).

Después de 24 h de cultivo, larvas de *Artemia* axénica (tratamiento IA) contuvieron células intestino-epiteliales oscuras y claras (Figura 3B). En el ciego hepático intestinal, algunas células oscuras estaban abiertas parcialmente y el material liberado hacia el lumen. Las células claras tuvieron una matriz fibrilar en el lumen del intestino anterior (Figura 3B). El sistema digestivo tuvo una región mesentérica con células epiteliales indiferenciadas y el lumen presentó una envoltura peritrófica acromática vacía (Figura 4B). La membrana peritrófica mostró una textura fibrosa (Figura 4B). No se observaron bacterias en el tracto intestinal de larvas bajo el tratamiento IA de los experimentos con las cepas 8N y 8L.

Tabla 1. Conteo de bacterias presentes en el agua de cultivo de *Artemia*, bajo experimentos de Prueba I. Los valores son expresados como logaritmos de base 10 de la media de las cuentas de células totales (Cels mL⁻¹), y cuentas de células viables (UFC mL⁻¹).

T	Unidades	Prueba con cepa 8N		Prueba con cepa 8L	
		0 h	24 h	0 h	24 h
IA	Cels mL ⁻¹	0	0	0	0
	UFC mL ⁻¹	0	0	0	0
IB	Cels mL ⁻¹	5.92 ^a (± 0.18)	6.05 ^a (± 0.08)	5.74 ^a (± 0.29)	6.99 ^a (± 0.12)
	UFC mL ⁻¹	5.65 ^a (± 0.22)	6.08 ^a (± 0.08)	6.33 ^a (± 0.32)	7.33 ^a (± 0.27)
IC	Cels mL ⁻¹	6.40 ^b (± 0.39)	6.44 ^b (± 0.09)	6.71 ^a (± 0.20)	8.09 ^b (± 0.14)
	UFC mL ⁻¹	5.64 ^a (± 0.13)	6.51 ^b (± 0.06)	5.98 ^a (± 0.24)	7.96 ^b (± 0.23)

T = Tratamientos: IA, Cultivo axénico de *Artemia*; IB, *Artemia* y bacteria; IC, *Artemia*, bacteria, y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Letras diferentes indican diferencia significativa entre promedios dentro de cada prueba con las cepas 8N o 8L: a < b a $P < 0.05$ (Prueba de Tukey). El valor entre paréntesis es la desviación estándar de N = 16. Los tratamientos fueron por duplicado con dos repeticiones.

En tratamiento IB con la cepa 8N, las larvas mostraron el lumen intestinal con el quimo el cual consistía de material particulado, y como se esperaba, solo un tipo de bacteria estuvo presente con la morfología celular de 8N (Figuras 3C, 3D). Bajo microscopio de luz, las bacterias no se mostraron estrictamente evidentes, pero las observaciones bajo el SEM permitieron distinguir claramente a las bacterias. Las larvas

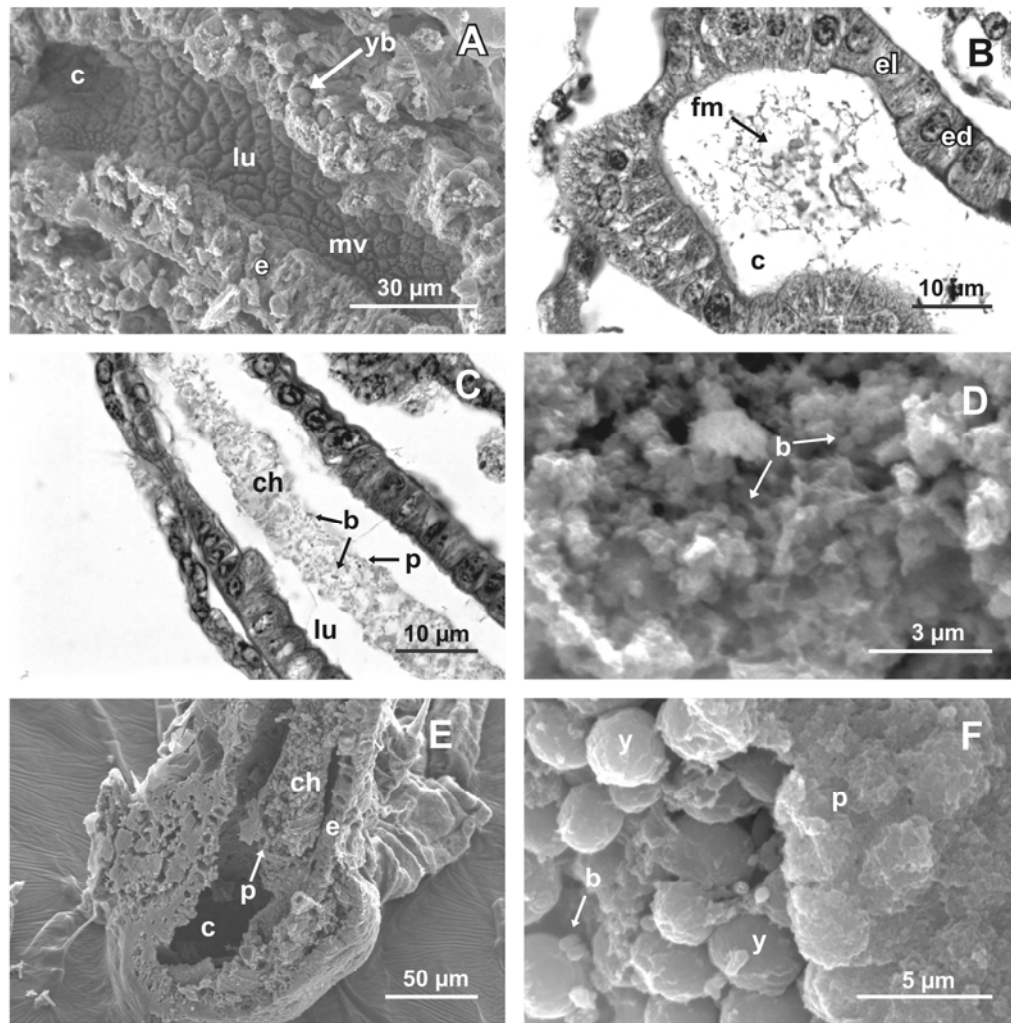


Figura 3. Micrografías de secciones media sagital de larvas de *Artemia* bajo pruebas de ingestión y localización de *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N (A, D-F = SEM; B y C = microscopía de luz). A. Nauplios bajo tratamiento IB al inicio de la prueba, mostrando la superficie interior de un lumen (lu) intestinal vacío, microvellosidades (mv), y cuerpos vitelinos (yb). B. Región cefálica de metanauplio I expuesto a tratamiento IA (condición axénica) durante 24 h de cultivo mostrando la región del estomodeo con células epiteliales oscuras (ed) y claras (el). Una matriz fibrilar (fm) es visible en el lumen del ciego hepatopancreático sin bacterias. C. La región mesenterón-proctodeo de un metanauplio I en tratamiento IB por 24 h mostrando el lumen intestinal y contiene el quimo (ch) con células de bacterias (b) cubierto por la membrana

peritrófica (p). D. Magnificación del quimo en intestino posterior de metanauplio en tratamiento IB de 24 h mostrando bacterias (b). E. Región cefálica de metanauplio en tratamiento IC (bacteria y levadura) de 24 h mostrando el ciego hepatopancreático (c), células epiteliales (e), y el quimo (ch) cubiertos por la membrana peritrófica (p). F. Magnificación del quimo del intestino posterior de metanauplio en tratamiento IC (bacteria y levadura) de 24 h y presentado células de levadura (y) y bacterias (b) adheridas a células de levadura circunscritas por la membrana peritrófica (p).

de *Artemia* en el tratamiento IB, con las cepas 8N y 8L, tuvieron el lumen intestinal con el quimo cubierto con una membrana peritrófica (Figuras 3C, 4C), la cual es una película delgada presente en el canal alimentario que limitó el contacto entre el quimo y la superficie epitelial intestinal a lo largo de la región mesentérica. Las larvas con cepa 8L mostraron una membrana peritrófica con dos zonas, una granular y otra fibrosa (Figura 4C). Las zonas granulares tuvieron cuerpos oscuros de manera predominante en una distribución homogénea que se consideran fueron células de la cepa 8L. En contraste, las zonas fibrosas tuvieron pocos cuerpos oscuros. Observaciones en el SEM confirmaron que las cepas 8N, y 8L estuvieron presente en mezcla con partículas que conformaron el quimo (Figuras 3D, 4D).

A las 24 h, las larvas en el tratamiento IC tuvieron un lumen intestinal lleno con alimento y el lumen estaba cubierto con una membrana peritrófica. En el espacio endoperitrófico, el alimento consistió de células de levadura mezcladas con células de 8N (Figuras 3E, 3F), o con células de la cepa 8L (Figuras 4E, 4F). La membrana peritrófica presentó una superficie irregular (Figura 3F). Las paredes celulares de algunas levaduras se observaron incompletas y deformes (Figura 4F).

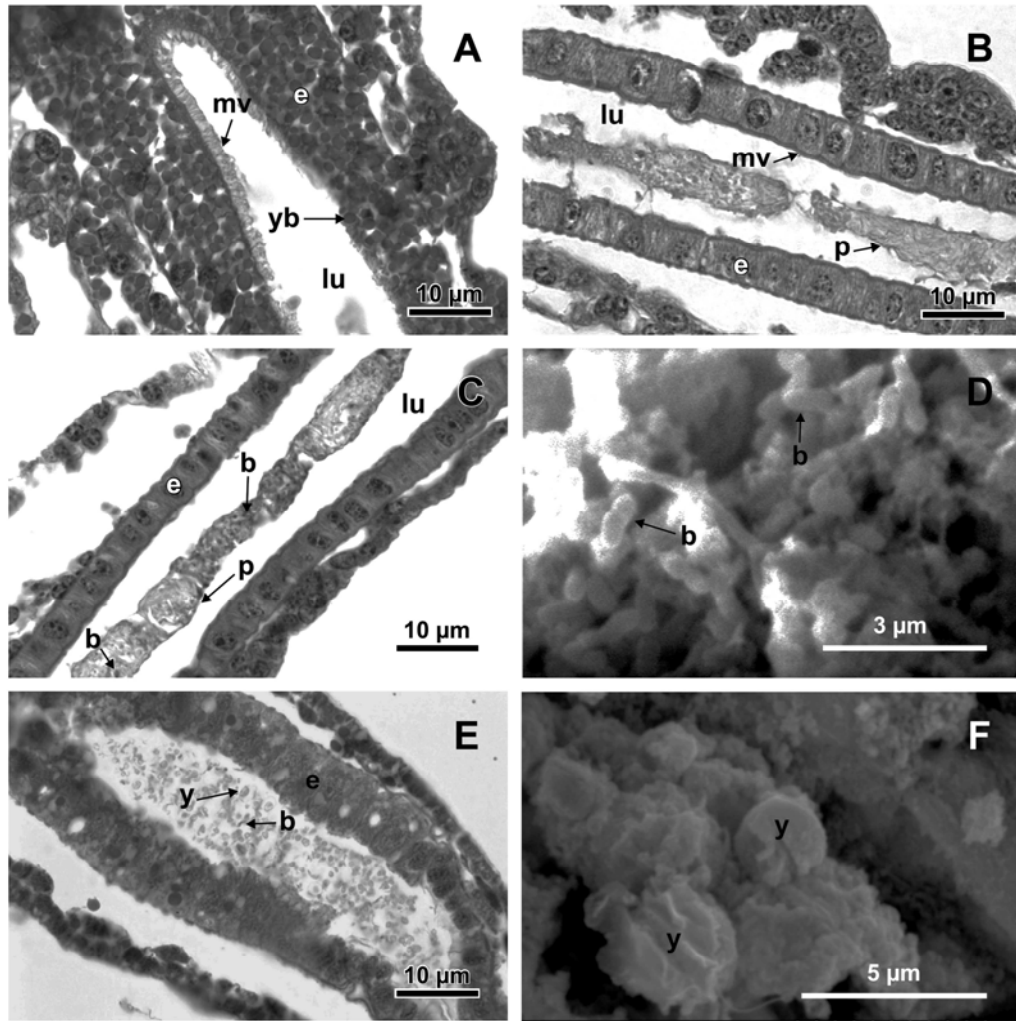


Figura 4. Micrografías de secciones media sagital de larvas de *Artemia* bajo pruebas de ingestión y localización de *Microbacterium* sp., cepa 8L (A-C, y E = microscopía de luz; D y F = SEM). A. Metanauplio I expuesto a tratamiento IA (cultivo axénico) a 0 h de cultivo mostrando el intestino anterior, células epiteliales (e) con abundantes cuerpos vitelinos (yb) y microvellosidades (mv) en formación. B. Metanauplio en tratamiento IA (cultivo axénico) de 24 h mostrando lumen (lu) del mesenteron con una membrana peritrófica (p) vacía, células epiteliales (e) y microvellosidades (mv). C. Metanauplio en tratamiento IB de 24 h presentando el lumen (lu) mesentérico con una membrana peritrofica envolviendo a bacterias (b). D. Quimo del intestino posterior de un metanauplio en tratamiento IB de 24 h mostrando bacterias (b) en mezcla con materia

orgánica. E. Metanauplio en tratamiento IC (bacteria y levadura) de 24 h presentando el lumen mesentérico con células de levadura (y) y bacterias (b). F. Quimo en el mesenteron de metanauplio bajo tratamiento IC con 24 h de cultivo exhibiendo células de levadura (y).

1.3.2. Viabilidad bacteriana

La ausencia de emisión fluorescente por la bacteria en el lumen intestinal de larvas de *Artemia* bajo condiciones axénicas fue confirmada al comienzo de todos los tratamientos (IIA a IID), y a las 24 h de incubación para el tratamiento IIA. En el tratamiento IIB, las larvas expuestas a la cepa 8N tuvieron áreas de emisión fluorescente verde (células vivas) y rojas (Figura 5B). En el mismo tratamiento, pero con la cepa 8L, fueron observadas áreas principalmente con emisión fluorescente roja, interpretado como presencia de células muertas (Figura 6B). Las larvas metanauplio en tratamiento IIC con cepa 8N y levadura presentaron áreas con emisión fluorescente verde a lo largo del intestino medio (Figura 5D), y con la cepa 8L y levadura tuvieron una mezcla de cuerpos fluorescentes rojos y verdes en el lumen del intestino medio (Figura 6D). Las observaciones bajo el microscopio de fluorescencia de bacterias suspendidas del agua de cultivo de *Artemia*, mostraron que las cepas 8N y 8L mantuvieron su viabilidad en los experimentos II.

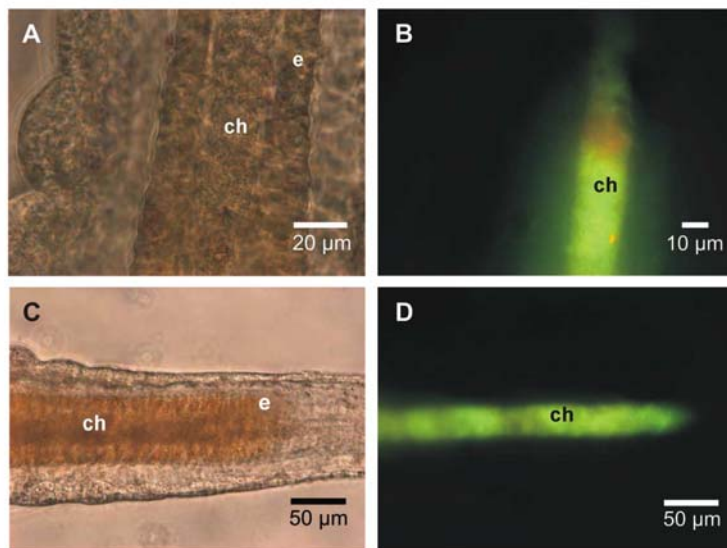


Figura 5. Microfotografías de larvas de *Artemia* bajo pruebas de viabilidad de *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N en lumen intestinal con fluorocromos LIVE/DEAD® BacLight™. (A y C = Microscopía de contraste de fases; B y D = microscopía de fluorescencia). A-B. Metanauplio I bajo tratamiento IIB (larva + bacteria) con 24 de cultivo mostrando el mesenteron del intestino epitelial con el quimo (ch). C-D. Metanauplios en tratamiento IIC (larvas + bacteria + levadura) de 24 h mostrando el contenido del mesenteron. (e) células epiteliales. Zona de color verde indica presencia de células vivas y zonas de color rojo la presencia de células muertas.

1.3.3. Detección molecular de cepas bacterianas por DGGE

Las dos bandas separadas en la línea del marcador de bacterias (M) correspondieron a la mezcla de productos de PCR de los cultivos de ambas cepas 8N, y 8L (Figura 7). No se obtuvieron señales de los productos de PCR de las cepas 8N y 8L del lumen intestinal de *Artemia* en condición de actividad natatoria pasiva (Figura 7); de la misma manera no se obtuvieron señales de los metanauplios no expuestos a bacterias (no mostrados en

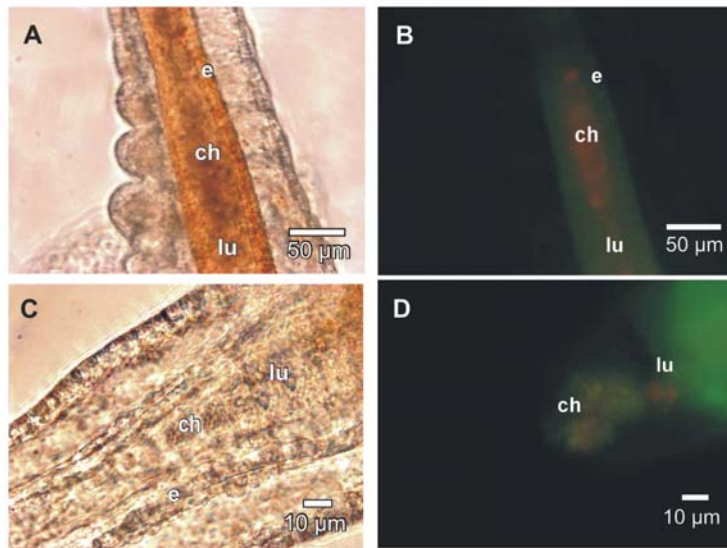


Figura 6. Microfotografías de larvas de *Artemia* bajo pruebas de viabilidad de *Microbacterium* sp. cepa 8L en lumen intestinal con fluorocromos LIVE/DEAD® BacLight™. (A y C = microscopía de contraste de fases; B y D = microscopía de fluorescencia). A-B. Metanauplio I expuesto a bacterias (tratamiento IIB) de 24 h de cultivo mostrando el lumen (lu) del intestino medio, el quimo (ch) y las células epiteliales (e). C-D. Metanauplio expuesto a bacteria y levadura (tratamiento IIC) a 24 h mostrando el quimo limitado por el mesenteron. Zona de color verde indica presencia de células vivas, zonas de color rojo la presencia de células muertas.

la Figura 7). El perfil de bandas de las líneas para el lumen intestinal de *Artemia* bajo condiciones activas, en cultivos monoxénicos y dixénicos (líneas 8N, 8L, y la mezcla 8N+8L) mostraron la señal correspondiente para 8N, pero no la señal para 8L. La extracción y cuantificación de ADN resultaron en un contenido mas bajo con la cepa 8L, que con la cepa 8N, utilizando una misma densidad bacteriana en el medio de cultivo (datos no mostrados). La amplificación de la misma cantidad de templado (50

ng) produjo un resultado positivo similar cuando las bandas de los productos de PCR fueron observadas como marcadores de bandas en el análisis de DGGE (M) (Figura 7).

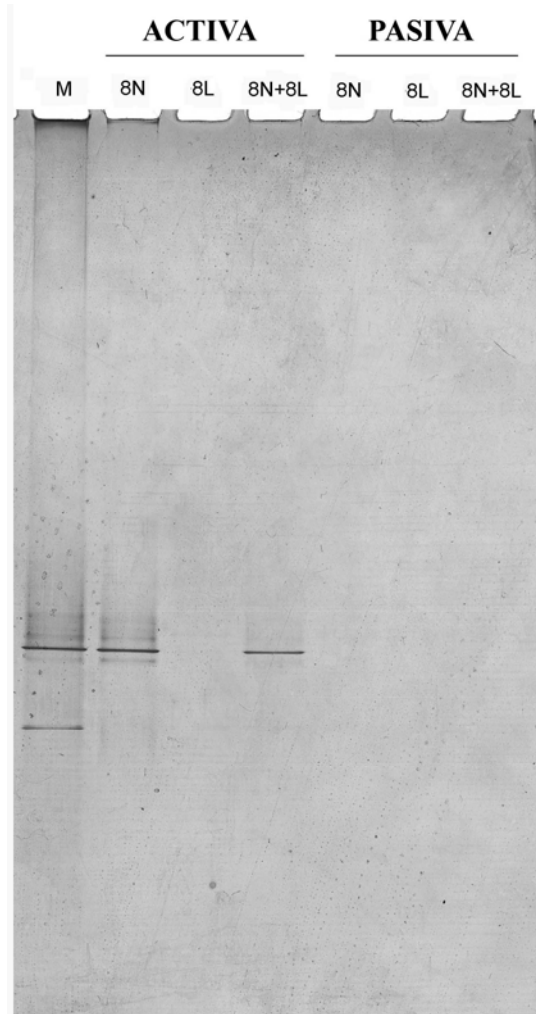


Figura 7. DGGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias en cultivos puros y de bacterias presentes en el lumen intestinal de *Artemia*. Línea M: Perfil de bandas de productos de PCR del 16S ADN_r obtenido de la mezcla de cultivos puros de *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N y *Microbacterium* sp., cepa 8L. Líneas de “Activa” = Larvas de *Artemia* activa expuestas por separado a las bacterias 8N, y 8L, y a la mezcla de éstas (8N + 8L). Líneas de “Pasiva” = Larvas de *Artemia* pasivas expuestas a las bacterias 8N y 8L, separadas y en mezcla.

1.4. DISCUSIÓN

1.4.1. Ingestión y viabilidad bacteriana en el lumen intestinal de *Artemia*

Se ha estudiado el efecto benéfico de diferentes especies de bacterias sobre el crecimiento y la producción de biomasa de *Artemia* asumiendo *de facto* su ingestión (Gorospe et al., 1996; Marques et al., 2005). Los resultados de SEM, microscopía de luz, y de fluorescencia (Figuras 3 a 6) demostraron que las cepas bacterianas 8N y 8L fueron ingeridas por los metanauplio de *Artemia*. Asimismo, ambas bacterias fueron detectadas por microscopía de fluorescencia como células vivas o muertas a lo largo del lumen intestinal de larvas de *Artemia* alimentada con y sin levadura comercial para pan (Figuras 5B, 5D, 6B, y 6D). Otros autores estudiaron la ingestión de bacterias por el camarón salmuera *Artemia* usando diferentes métodos. Soto-Rodríguez et al. (2003) propusieron el uso del fluorocromo DTAF (para microscopía de fluorescencia) y demostraron la ingestión de tres cepas de *Vibrio harveyi*. No obstante, este método no permitió la discriminación entre bacterias vivas y muertas, y con frecuencia hubo una difusión del fluorocromo dentro de todos los tejidos de *Artemia*. En previos ensayos de la presente investigación, con bacterias teñidas con el fluorocromo BacLight™, mostraron células de bacterias individuales dentro del lumen intestinal de *Artemia*. La tinción de las bacterias cargadas dentro del lumen intestinal (*in situ*) ofreció información acerca del estado fisiológico de la bacteria ingerida. Sin embargo, las imágenes de células bacterianas monodispersas fueron inciertas, y el fluorocromo SYTO 9 también tiñó las células epiteliales emitiendo un ligero color verde (Figura 5B, 6B). Con microscopía electrónica de transmisión, Verschuere et al. (2000) demostraron

la presencia del patógeno *Vibrio proteolyticus* CW8T2 en el epitelio intestinal de *Artemia*, aunque ellos no determinaron cómo ingresó la bacteria al lumen intestinal.

La idea generalizada de que *Artemia* es un organismo que se alimenta por filtración no selectiva (Marques et al., 2006; Sorgeloos et al., 2001) debería ser re-evaluado ya que varios estudios han demostrado su capacidad selectiva de partículas suspendidas de diferente tamaño. Makridis y Vadstein (1999) reportaron que metanauplios de *Artemia* prefirieron partículas de 4 a 8 μm , y Gelabert (2001) determinó una mayor frecuencia de filtración para partículas de 4 a 18 μm , con la más alta captura para partículas de 10 μm en individuos de 1 a 1.9 mm de longitud total. Ha sido demostrado que la preferencia de *Artemia* por un rango de tamaño determinado de partículas suspendidas incluyendo bacterias, esta influenciada por la concentración de las partículas (Gelabert, 2003), la etapa larval (Gelabert, 2001; Makridis y Vadstein, 1999), el tiempo de exposición (Gómez-Gil et al., 1998; Bergh et al., 2001), la especie, y el estatus de la bacteria (viva o muerta) (Gómez-Gil et al., 1998). En este estudio con metanauplios de *Artemia* demostramos la ingestión de las células de bacterias 8N con 0.5 a 0.75 μm de diámetro y 0.8 a 3.0 μm de longitud (López-Cortés et al., 2006) y la cepa 8L con 0.32 a 0.5 μm de diámetro y 0.79 a 1.27 μm de longitud. Aunque no tenemos datos directos sobre la filtración diferencial y/o la ingestión de células de estas cepas por *Artemia*, los análisis de DGGE dieron una señal positiva solo para la cepa 8N, sugiriendo la ocurrencia de una mayor ingestión. La ingestión diferencial de bacterias ha sido también reportado en la filtro-alimentador almeja marina *Argopecten purpuratus*, la cual fue expuesta a una mezcla de bacterias (Riquelme et al., 2000). De acuerdo a Muyzer et al. (1993), la sensibilidad del DGGE para una detección diferencial de cepas específicas dentro de una comunidad bacteriana depende de la cantidad del

templado de ADN cepa-específico. Así, otra explicación a la ausencia de una señal para la cepa 8L en los análisis de DGGE es por una generación diferencial de productos de PCR. Farrelly et al. (1995) sugirieron que la producción diferencial en la amplificación por PCR de ADN podría ser causado por el tamaño del genoma en las células bacterianas y por la organización y número de genes del 16S ARNr. Aunque no tenemos información sobre el genoma y la organización de genes del 16S de las cepas 8N y 8L, observamos que la cantidad del templado de ADN obtenido de concentración celular similar fue siempre mayor para la cepa 8N. En un estudio de poblaciones de bacterias presentes en el tracto digestivo del pez *Oncorhynchus mykiss*, comparando entre la técnica de librerías génicas del gen 16S ARNr y el DGGE, el DGGE subestimó la diversidad de las comunidades de bacterias (Kim et al., 2006).

La evaluación de viabilidad de bacterias suspendidas en cultivos de *Artemia* ha sido determinada utilizando mediante la siembra en placas y la tinción con sales de tetrazolium MTT (Marques et al., 2005). En nuestro estudio, la viabilidad en la prueba I fue evaluada por siembra en placas y en la prueba II mediante el uso del indicador fluorescente BacLight^{MT}. Los resultados mostraron que las bacterias estuvieron viables tanto al inicio como al final de las evaluaciones (0 y 24 h) (Tabla I).

1.4.2. Localización de bacterias en lumen intestinal de *Artemia*

Para las diferentes etapas de desarrollo de *Artemia* en condiciones agnotobióticas, Hansen y Peters (1997) describieron la membrana peritrófica (MP) como una estructura microfibrilar. La MP en nuestros metanauplios de *Artemia* también mostraron una estructura microfibrilar (Figura 4B). Además, observamos que larvas metanauplio aún

sin alimento y sin bacteria desarrollo una membrana peritrófica. Estos resultados sugieren que la formación de la MP en *Artemia* no es promovida por un contacto con bacterias ni por una distensión intestinal como es propuesto para algunos insectos (Terra, 2001). En todos los experimentos de *Artemia* con bacteria, las bacterias estuvieron confinadas dentro del espacio de la MP, esto es, la unión de las bacterias sobre el epitelio intestinal no fue observada. La MP de metanauplio separó el quimo (incluyendo células de 8N y 8L) del epitelio intestinal, de esta manera confirmamos una de las funciones de la MP como una barrera para el contacto directo entre el quimo y el epitelio (Hootman y Conte, 1974; Martin et al., 2006; Reeve, 1963). Para el establecimiento de una comunidad microbiana en el lumen intestinal de organismos acuáticos, se ha considerado importante que el tracto alimentario presente estructuras tales como bolsas, pliegues, ciegos (Harris, 1993), no obstante, larvas de *Artemia* tienen un intestino simple con un incipiente ciego hepatopancreático en la región anterior (Hootman y Conte, 1974; Snyder y Wolfe, 1980). Entonces, la colonización de las bacterias ingeridas 8N y 8L parece estar limitada debido a que la MP es impermeable a partículas hasta de 327 nm de tamaño (Hansen y Peters, 1997) y por que la MP es desplazada con el quimo hacia el exterior durante la digestión (Bergh et al., 2001; Reeve, 1963). Otro posible ingreso de bacterias es a través del ano apoyado por movimientos antiperistálticos de éste (Snyder y Wolfe, 1980; Lovett y Felder, 1990). Algunas bacterias han sido reportadas adheridas a la región intestinal posterior en crustáceos acuáticos (Harris, 1993; Ampe y Thiéry, 1998; Hug et al., 1986; Lau et al., 2002). Sin embargo, no observamos células de 8N y 8L adheridas al epitelio intestinal posterior de los metanauplios.

El establecimiento de comunidades bacterianas en crustáceos ha sido relacionado a su capacidad para adherirse a la superficie quitinosa. Tal capacidad es un importante factor de patogenicidad de especies de *Vibrio* spp. En *Artemia* y otros crustáceos (Verschuere et al., 2000; Hug et al., 1986; Gunther y Catena, 1980). Otros autores reportaron que la bacteria *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* inhibieron la actividad natatoria mediante la formación de agregados sobre la superficie de los apéndices externos, causando así la muerte de larvas de *Artemia* (Gunther y Catena, 1980). Aunque algunas células mono-dispersas de 8N y 8L estuvieron unidas a la superficie externa de metanauplios, no fueron observados agregados celulares sobre sus apéndices.

1.4.3. Vías de acción benéfica de bacterias

En estudios previos, la cepa bacteriana 8N y 8L en bioensayos dixénicos con larvas de *Artemia* produjo un efecto positivo sobre el desarrollo y crecimiento larval (Orozco-Medina et al., 2002). Los resultados del presente trabajo sugieren que las influencias benéficas de estas cepas ocurre en el espacio endoperitrófico limitado por la MP. En contraste, otros estudios han sugerido una asociación simbiótica en el espacio ectoperitrófico entre los microorganismos y branquiópodos no-*Artemia* (Ampe y Thiéry, 1998) e insectos (Tokuda et al., 2000). Un probable beneficio aportado por las cepas 8N y 8L pudo haberse dado por la acción enzimática bacteriana sobre las células de levadura volviendo biodisponibles los nutrientes para la *Artemia*. La cepa 8N tiene la capacidad para oxidar el compuesto N-acetil glucosamina (López-Cortés et al., 2006), la cual es un importante constituyente de la pared celular de levaduras (Aguilar-Uscanda y

François, 2003). Por otro lado, Marques et al. (2006) mencionaron que el probable efecto benéfico de estas cepas 8N y 8L fue debido a que funcionaron como un complemento nutricional para la *Artemia* o como una influencia positiva en las condiciones de cultivo. El uso de biomasa bacteriana como un complemento alimenticio es probable ya que la levadura es una dieta sub-óptima para *Artemia* (Marques et al., 2005; Coutteau et al., 1990; Marques et al., 2004). Utilizando otra dieta sub-óptima (salvado de arroz) con la bacteria *Pseudomonas* sp., la *Artemia* presentó un mejoramiento en la supervivencia (> 80 %) y el crecimiento (> 2.5 mm de longitud) a 9 días de cultivo, con la contribución de proteínas y amino ácidos esenciales de la bacteria (Gorospe et al., 1996).

Concluimos que las bacterias *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N (DSM 16483^T), y *Microbacterium* sp. cepa 8L (DSM 16485^T) fueron ingeridas por metanauplios de *Artemia franciscana*, las cuales estuvieron presentes en estatus de viables y no viables dentro del lumen intestinal. Las bacterias fueron localizadas dentro del quimo circunscritas por la membrana peritrófica y sin evidencia de estar adheridas al epitelio intestinal.

CAPÍTULO 2

Actividad y digestibilidad aparente de proteasas extracelulares de *Exiguobacterium mexicanum* 8N *Microbacterium* sp., 8L sobre proteínas de levadura, determinado por SDS-PAGE y ensayos *in-vitro* por pH-stat multi-enzimático

2.1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas extracelulares de bacterias han sido evaluadas para aplicaciones industriales, incluyendo para la industria del alimento (Haki, 2003). Los microorganismos estudiados en este respecto son predominantemente bacterias heterotróficas Gram-positivas del género *Bacillus* y *Lactococcus* (Rao, 1998, Kumar, 2004). En particular, estudios de microorganismos (bacterias) asociados al lumen intestinal de crustáceos marinos han demostrado una importante participación de enzimas (proteasas entre otras) de las bacterias en el proceso nutricional de los hospederos (Donachie, y Zdanowski, 1998, Ochoa-Solano y Olmos-Soto, 2006).

Las bacterias heterótrofas Gram-positivas aeróbicas *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N y *Microbacterium* sp., cepa 8L, presentaron influencia positiva en el crecimiento y el desarrollo larvario del camarón salmuera *Artemia franciscana* en cultivos gnotobióticos, usando la levadura para pan *Saccharomyces cerevisiae* como alimento (Orozco-Medina et al., 2002). En cultivos agnotobióticos (xénicos), estas cepas bacterianas indujeron aumento significativo en el desarrollo y supervivencia de A.

franciscana usando por separado *S. cerevisiae*, harina de maíz, o espirulina como alimento (Hipólito-Morales et al., 2008). Los efectos benéficos de bacterias en cultivos de *Artemia* han sido explicados por una contribución bacteriana de suplementos nutricionales o por la competición bacteriana en la cual bacterias patógenas son excluidas (Gorospe et al., 1999; Marques et al., 2005). Un modo probable de acción de las bacterias 8N y 8L para proveer un efecto benéfico en *Artemia* cultivada puede ser actuando a nivel del tracto intestinal. Orozco-Medina et al. (2008) estudio la interacción de estas bacterias en particular y el lumen intestinal de *Artemia*, y reportó que las células de las cepas 8N y 8L estuvieron confinadas dentro del quimo en el espacio limitado por la membrana peritrófica, y no observaron evidencia en la que dichas bacterias estuvieran adheridas o colonizando el epitelio intestinal. Entonces estas bacterias benéficas pueden estar funcionando directamente como suplemento alimenticio o apoyando en la digestión del alimento. En nuestro trabajo, sustancias poliméricas extracelulares (SPEs) de las bacterias *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N, y *Microbacterium* sp. cepa 8L, las bacterias patógena *Microbacterium* sp., cepa 8R, y *Vibrio parahaemolyticus* (Orozco-Medina et al., 2002) fueron estudiadas para obtener conocimiento acerca de la función benéfica de las bacterias 8N y 8L asociadas a *Artemia*. Nuestros objetivos fueron determinar la presencia y actividad de proteasas extracelulares mediante electroforesis SDS-PAGE y sustrato-SDS-PAGE y evaluar la aparente digestibilidad de tales proteasas sobre las proteínas de levadura, mediante ensayos de digestibilidad-*in vitro* por el método pH-Stat multienzimático.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (SPEs)

Cultivos puros de *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N (López-Cortés et al., 2006), *Microbacterium* sp., cepa 8L (DSM 16485^T), *Microbacterium* sp., cepa 8R, y *Vibrio parahaemolyticus* (588 CECT) (Orozco-Medina et al., 2002) fueron obtenidos en caldo marino 2216 (DIFCO), incubados a 30 °C, por 24 h, a 100 rpm de agitación. La concentración celular de los cultivos en etapa tardía de la fase logarítmica de crecimiento poblacional, fue determinado basado en la densidad óptica a 580 nm (Orozco-Medina et al., 2002). Para obtener las sustancias poliméricas extracelulares (SPEs), incluyendo proteínas solubles, de cada cepa y del medio de cultivo caldo marino 2216 estéril usado como el control, el cultivo bacteriano correspondiente fue agitado 1 min en un vortex mezclador y centrifugado a 6000 × g, 15 min a 2 °C; el sobrenadante con las SPEs fue recuperado y las células bacterianas remanentes en él fueron filtradas con membrana de nitrato celulosa Wattman 7182-004 con tamaño de poro de 0.2 µm. Las SPEs fueron concentradas en una relación 10:1 de su volumen en un ultrafiltrador Millipore 8050, utilizando una membrana de celulosa regenerada Millipore YM10 con capacidad de bloqueo de partículas de hasta 10 kDa de peso molecular. La solución concentrada de SPEs fue usada como extracto enzimático. Todos los extractos enzimáticos fueron manejados en hielo y almacenados a -56 °C (ver diagrama en Figura 8).

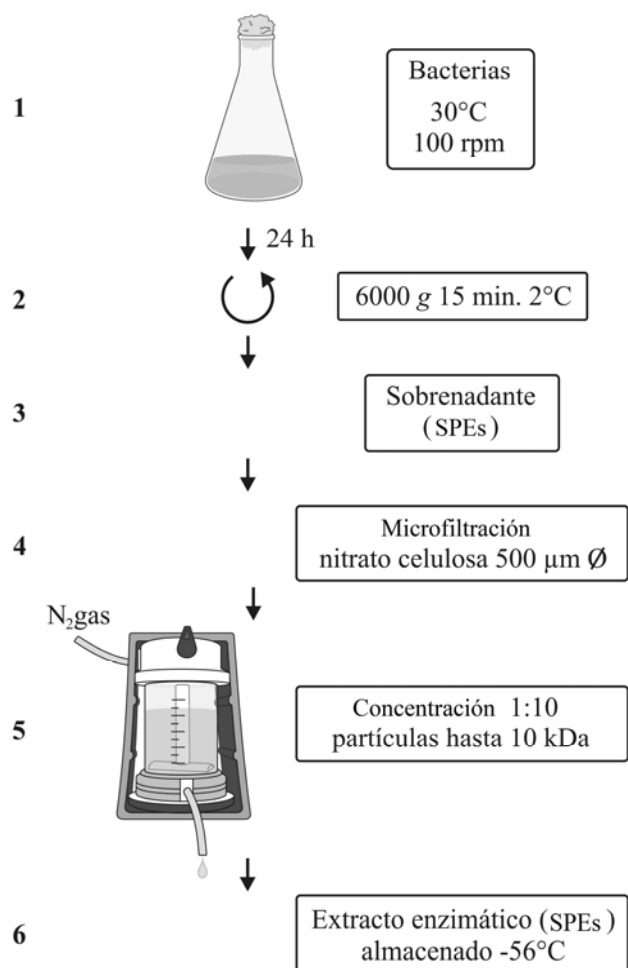


Figura 8. Diagrama de flujo para la extracción de sustancias poliméricas extracelulares de bacterias en medio de cultivo líquido 2216. ⤵ = Centrifugar.

2.2.2. Presencia y actividad de proteasas extracelulares

La presencia de proteínas solubles en las SPEs fue determinada por el método de Bradford (1976), adaptado a una microplaca. En breve, 20 µL de SPEs, 30 µL de agua destilada, y 250 µL de solución de Bradford fueron colocados en microplacas de 96 pozos y la absorbancia determinada a 595 nm. La proteína de suero de bovino SIGMA

A7517 a 0.1 mg mL^{-1} fue utilizada como el estándar. La actividad enzimática proteolítica total de las SPEs fue estimada usando azocaseína como el sustrato (García-Carreño y Haard, 1993). En breve, $5 \text{ }\mu\text{L}$ de preparación enzimática fue incubada en $500 \text{ }\mu\text{L}$ de amortiguador TRIS·HCl 50 mM en un pH 7.5 y $500 \text{ }\mu\text{L}$ de azocaseína al 0.5 % como sustrato en TRIS·HCl 50 mM a pH 7.5 por 10 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La reacción fue detenida con $500 \text{ }\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA) 20 % peso/volumen. Las muestras fueron centrifugadas a $6500 \times g$ por 5 min y la absorbancia del sobrenadante registrada a 366 nm. Para muestras control fue añadido TCA antes del sustrato. La actividad específica de las proteasas (unidad de actividad = U) fue calculada a partir de la tasa de absorbancia a 366 nm y expresada como la unidad de cambio de absorbancia por minuto, por mg de proteína presente en el extracto crudo de la SPEs ($\Delta A_{366} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

2.2.3. SDS-PAGE de las SPEs

Las proteínas y su peso molecular en los concentrados SPEs fueron evaluadas en electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), con 15 % de poliacrilamida y 0.1 % de SDS basado en el método de Laemmli (1970), en un equipo MiniProtean sistema II Bio-Rad 1970.

La electroforesis fue hecha a una corriente constante (15 mA por gel) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ usando un baño de circulación fría. Las bandas de proteínas separadas fueron teñidas con una solución que contenía metanol al 40 %, ácido acético al 7 %, y azul brillante de Coomassie R-250 al 0.5 %. Después de 2 h el exceso de tinte fue removido con una solución que contenía metanol al 40 % y ácido acético al 7 %. Las bandas de proteínas fueron reveladas en fondo claro (García-Carreño et al., 1993).

La actividad enzimática de proteasas fue revelada en sustrato-SDS-PAGE (S-SDS-PAGE) (García-Carreño y Haard, 1993). Para determinar la presencia de tripsina y serin proteasas en los extractos, dos inhibidores específicos fueron usados, 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona HCl 10 mM (TLCK), y fenilmetil sulfonil fluoruro 100 mM (PMSF), respectivamente. Mezclas de 25 µL de las SPEs y 7.5 µL del inhibidor, o agua destilada para el control positivo en lugar del inhibidor, fueron incubadas 1 h a 25 °C, y luego la mezcla fue combinada 1:1 con un amortiguador de carga y SDS antes de cargar en el gel (García-Carreño y Haard, 1993). Después de la electroforesis, los geles fueron inmersos en una solución de caseína al 3 % (SIGMA C7080) en amortiguador TRIS-HCl 50 mN a pH 7.5 y colocados 30 min en baño de hielo bajo agitación orbital a 50 rpm, y posteriormente incubados por 2 h a 25 °C. Los geles fueron luego lavados e inmersos toda la noche en una solución de tinción (previamente descrito). El exceso de tinte fue luego removido con solución de destinción (descrito arriba), y bandas claras de áreas de degradación de caseína generadas por la actividad de las enzimas proteolíticas fueron reveladas sobre un fondo azul (García-Carreño et al., 1993).

2.2.4. Ensayos de digestibilidad *in-vitro* multienzimático por el método pH-Stat

El grado de hidrólisis de proteína (GH%) de levadura comercial para pan (esterilizada por autoclave) usando las SPEs de las bacterias *E. mexicanum* cepa 8N, *Microbacterium* sp. cepa 8L, *Microbacterium* sp. cepa 8R, *V. parahaemolyticus*, y la mezcla de las SPEs de la cepa 8L con 8N (tratamientos 8N, 8L, 8R, VP, y 8L+8N, respectivamente) fue evaluado por el método pH-Stat (Pedersen and Eggum, 1983; Ezquerro et al., 1997;

Lemos et al., 2004). El GH% de la proteína de levadura por las enzimas presentes en las SPEs fue determinado con un Stat Tritino 718 (Metrohm Ion Analysis, Switzerland) con interfaz a una computadora (Metrodata Menu Computer Program 718 STAT TritinoPC). La cantidad apropiada de levadura disuelta en agua destilada para obtener 0.08 g de proteína, fue colocada en el contenedor de hidrólisis. La masa de reacción total fue ajustada para alcanzar 10 g (sustrato + agua + enzima = 10 g). El pH de esta mezcla fue ajustada a 7.9 con una solución de NaOH 1 mol L⁻¹ y agitada por 1 hora para obtener la solubilización completa de proteína y la estabilización del pH. Antes de iniciar la reacción hidrolítica, el pH fue elevado automáticamente a 8.0 por el sistema pH-Stat mediante la adición de NaOH 0.1 M. La reacción fue iniciada por la adición del volumen de SPEs equivalente a 0.5 U de actividad proteolítica (medida con azocaseína como sustrato) de cada cepa bacteriana (con pH previamente ajustado a 8.0). Cuatro repeticiones de cada tratamiento fueron hechos. La mezcla de reacción fue mantenida a 30 °C por 1 h usando un vaso de reacción con cámara externa de circulación de agua con control de temperatura. El programa informático 718 STAT TritinoPC fue usado para determinar el GH% de proteína basado en el algoritmo descrito por Alder-Nissen (1986). El GH% de la levadura sin la adición de SPEs, fue usado como un control usando el procedimiento arriba descrito.

2.2.5. SDS-PAGE de productos de digestión

El proceso de hidrólisis fue seguido durante del tiempo de reacción en SDS-PAGE. Submuestras tomadas durante el proceso de hidrólisis (25- μ L por muestra) contuvieron 20-30 μ g de proteína y fueron mezcladas con 25 μ L de amortiguador de carga con SDS.

Las muestras fueron cargadas en geles SDS-PAGE al 15 %, y teñidas según arriba descrito. Las bandas de proteínas observadas en los geles de SDS-PAGE fueron analizadas usando el programa GelCompar II Ver. 4.6TM, y los índices eurísticos fueron obtenidos utilizando el programa PAST Ver. 1.67 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>). Los resultados de cuenta total de bacterias en cultivos, el contenido de proteína soluble de las SPEs, y el GH% de la proteína de levadura, fueron analizados por el método no paramétrico de análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis, usando el programa StatisticaTM Ver. 7.0 StatSoft. Inc.

2.2.6. SDS-PAGE-S de extracto enzimático de *Artemia* bajo cultivo gnotobiótico

Cultivos gnotobióticos de larvas de *Artemia* obtenidos de acuerdo al método descrito en Orozco-Medina et al. (2002) fueron llevados a cabo para determinar si larvas de *Artemia* con presencia de la bacteria *Exiguobacterium mexicanum* 8N presentaban una diferencia en las bandas de actividad enzimática de proteasas en geles de SDS-PAGE con sustrato, a 6 días de cultivo a partir de etapa nauplio. Los tratamientos fueron, A) *Artemia* en cultivo axénica con levadura esterilizada por autoclave, y B) *Artemia* monoxénica con levadura y la bacteria *E. mexicanum* cepa 8N. Cada tratamiento con 7 repeticiones de 20 larvas, cultivados en dos ocasiones. Para la obtención del extracto crudo de proteína las larvas fueron lavadas en agua destilada estéril, homogenizadas manualmente (sobre hielo) con pistilo en un volumen de 100 μ L de agua destilada estéril. El homogenizado fue centrifugado a $10000 \times g$ 30 min a 1 °C, y conservado a -56 °C.

El extracto de proteína de *Artemia* fue utilizado como extracto enzimático de *Artemia* (EEA) para la determinación de actividad enzimática de proteasas en S-SDS-PAGE con sustrato de caseína. Se utilizaron los inhibidores TLCK y PMSF en muestra de EEA para la determinar la presencia de tripsinas y serin proteasas en general. Los procesos para la obtención de los zimogramas S-SDS-PAGE son los descritos anteriormente.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Proteínas solubles y actividad de proteasas extracelulares

Concentraciones de bacterias entre 4.1×10^{10} a 9.1×10^{14} bacteria mL^{-1} (Tabla II) mostraron contenido de proteína soluble de 0.09 a 3.08 mg mL^{-1} de SPEs. *Vibrio parahaemolyticus* (VP) tuvo la más alta producción de proteína (3.08 mg.mL^{-1}) y la más alta concentración de bacterias ($P < 0.05$). Las SPEs de la cepa 8L produjo la más alta ($P < 0.05$) actividad enzimática (3.05 U) a la más baja concentración de bacterias. La más baja actividad proteolítica fue en el tratamiento 8N con valor de 0.1 U (Tabla II).

2.3.2. SDS-PAGE-sustrato de las SPEs

En los zimogramas se observó que las SPEs presentaron una banda de actividad de 28.0 kDa para los tratamientos 8L y 8R, sin efecto inhibitorio en muestras incubadas con PMSF y TLCK (Figura 9). El tratamiento 8N tuvo bandas de proteasas de 24.0, 26.8, 56.6, y 61.0 kDa, pero cuando fueron incubados con PMSF, un inhibidor específicos

para proteasas del tipo serino, la banda de actividad a 24.0 kDa fue totalmente inhibida y la banda de actividad a 56.6 kDa fue parcialmente afectada. Las SPEs de *V. parahaemolyticus* tuvieron dos bandas de actividad de 43.5 y 51.3 kDa, con la última parcialmente inhibida por el PMSF (Figura 9)

2.3.3. Digestión de proteínas de levadura con las SPEs por el método pH-stat

La proteína de levadura esterilizada por autoclave fue hidrolizada con las SPEs de bacterias y evaluada por el método pH-stat. El más alto GH% fue medido cuando las SPEs del patógeno *V. parahaemolyticus* fue usado para hidrolizar la proteína de levadura seguido por la mezcla de las cepas 8L y 8N; 29 %, y 28 % ($P < 0.05$). Los tratamientos 8L y 8N no mostraron diferencia en la hidrólisis de proteína de levadura con valores de GH% de 15 % y 17 % ($P < 0.05$, Tabla II).

2.3.4. SDS-PAGE de productos de digestión con las SPEs de bacterias

EL GH% de proteína de la levadura esterilizada por autoclave causado por las proteasas extracelulares en los tratamientos 8L, 8N, 8R, y VP mostraron una capacidad digestiva de las SPEs en geles de SDS-PAGE en un tiempo de reacción de 1 a 5 min (Figura 10).

Las mezclas de reacción conteniendo 8L, 8R, y la mezcla 8L+8N tuvieron casi digestión completa en un minuto. Los resultados fueron confirmados con el índice de similitud de Dice usado sobre las bandas de proteína. El tratamiento 8L tuvo un índice Dice de 0.11 a 1 min de reacción comparado con el sustrato sin SPEs (un índice Dice de 1 representa iguales perfiles de bandas). En cambio, las SPEs de 8N tuvieron una capacidad aparente

mas baja para digerir la proteína de levadura, mostrado por las bandas de proteínas que fueron conservadas en todas las muestras. Las bandas de proteínas de 8N tuvieron un índice de similitud Dice de 0.8 en 1 h de reacción comparado con el control (columna S del gel 8N, Figura 10). Valores del índice de similitud Dice de digestión de proteínas

Tabla II. Concentración de bacterias y contenido de proteínas en el extracto de sustancias poliméricas extracelulares (SPEs); su actividad enzimática en azocaseína, y grado de hidrólisis (GH%) sobre la proteína de levadura. SPEs de *Microbacterium* sp. 8L, *Exiguobacterium mexicanum* 8N, *Microbacterium* sp. 8R, y *Vibrio parahaemolyticus* (indicado como VP).

Tratamiento	Bacteria mL ⁻¹	mg de proteína mL ⁻¹ de SPEs	Actividad (U) ¹	GH%
8L	4.1×10 ¹⁰ (2.2×10 ⁹) ^a	1.30 (0.05) ^b	3.05	15.4 (1.99) ^b
8N	3.3×10 ¹³ (4.7×10 ¹²) ^c	2.80 (0.09) ^c	0.10	16.5 (2.02) ^b
8R	6.3×10 ¹¹ (7.4×10 ¹⁰) ^b	0.94 (0.05) ^a	1.91	11.2 (0.90) ^a
VP	9.1×10 ¹⁴ (5.5×10 ¹⁴) ^d	3.08 (0.10) ^d	0.17	29.3
8L+8N	*	*	*	27.8 (4.83) ^c

SPEs = Sustancias poliméricas extracelulares.

¹ U = Una unidad es la absorbancia a 340 nm min⁻¹ mg proteína⁻¹. Los valores entre paréntesis son la desviación estándar de n = 4. Diferentes letras en superíndice indican diferencia significativa entre rangos: a < b < c < d, a una P < 0.05 (Prueba de Kruskal-Wallis). * Valores no determinados debido a que la mezcla de 8L+8N fue hecha con los SPEs de cada cepas.

por las SPEs de 8L+8N y 8R fueron 0.14 y 0.21 a los 60 min. Las SPEs de VP tuvieron una mas baja digestión con un índice Dice de 0.5 de similitud en 1 h de hidrólisis como fue determinado en SDS-PAGE (Figura 10).

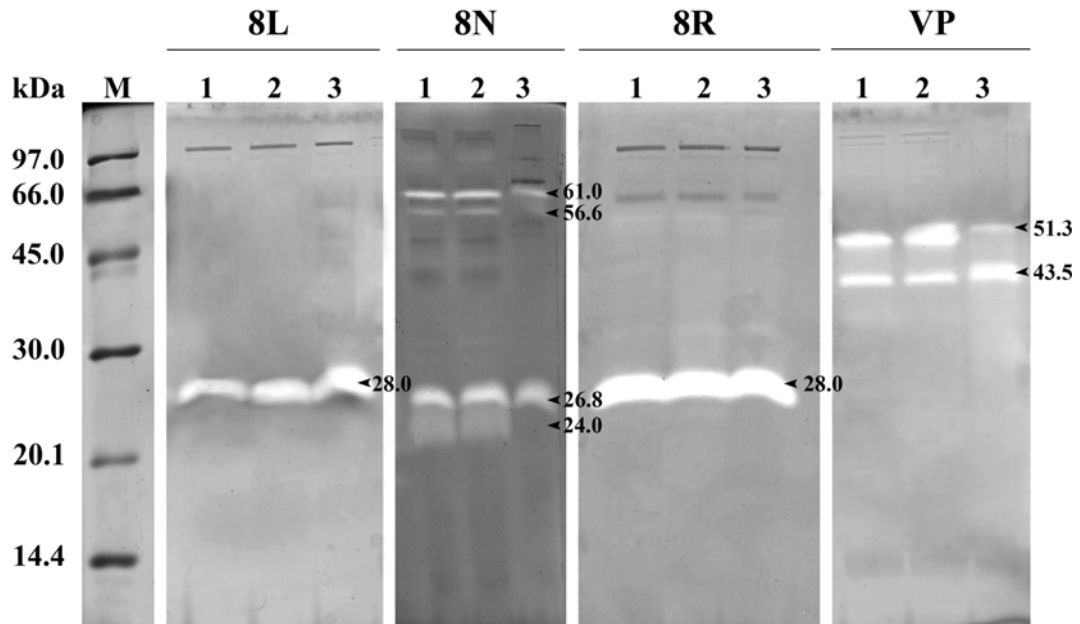


Figura 9. Zimogramas con caseína como sustrato, de los extractos enzimáticos extracelulares (o sustancias poliméricas extracelulares, SPEs) de las cepas bacterianas *Microbacterium* sp. 8L, *Exiguobacterium mexicanum* 8N, *Microbacterium* sp. 8R, y *Vibrio parahaemolyticus* (VP). 1 = Sin inhibidor, 2 = Con TLCK inhibidor para tripsinas, 3 = Con PMSF inhibidor para serin proteasas.

2.3.5. SDS-PAGE-S de extracto enzimático de *Artemia* bajo cultivo gnotobiótico

Los extractos enzimáticos de larvas de *Artemia* mostraron actividad enzimática en los zimogramas en un ambiente ligeramente alcalino (pH 7.5), con bandas de actividad de

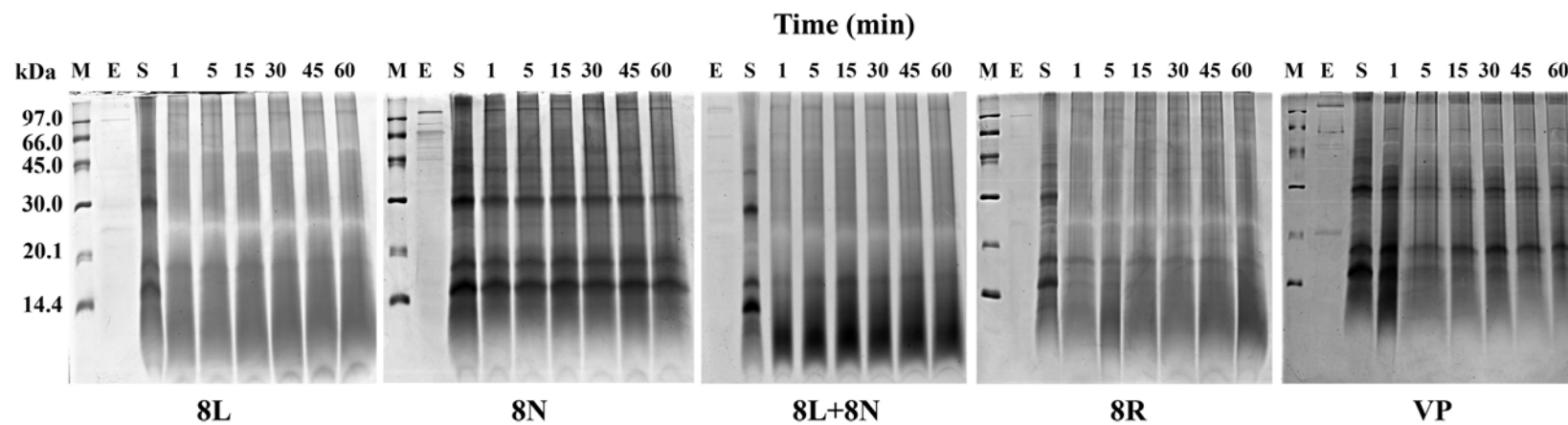


Figura 10. Patrón de proteínas en geles de SDS-PAGE, con carga de proteína de levadura incubada con extractos enzimáticos de productos extracelulares (SPEs) de las bacterias *Microbacterium* sp. 8L, *Exiguobacterium mexicanum* 8N, *Microbacterium* sp. 8R, y *Vibrio parahaemolyticus* (VP), a través del tiempo de 1, 5, 15, 30, 45, y 60 min de digestibilidad *in vitro* en un titulador pH-Stat. M = Marcadores de peso molecular, E = Extractos enzimáticos, S = Sustrato.

proteasas similares en ambos tratamientos con bacteria 8N (A+8N) y sin bacteria (A) (Figura 11). Las bandas de actividad tuvieron masa molecular de 16.5, 18.5, 21.6, 24.7, y 27.0 kDa. En larvas de *Artemia* sin bacteria mostró la presencia de proteasas tipo tripsina de 21.6 kDa, sin embargo, cuando esta presente la bacteria 8N no se observó la inhibición de la correspondiente banda de actividad. Por el contrario, la presencia de la bacteria 8N reveló una proteasa tipo tripsina de 18.5 kDa, de manera mas evidente que en larvas sin bacterias (Figura 11).

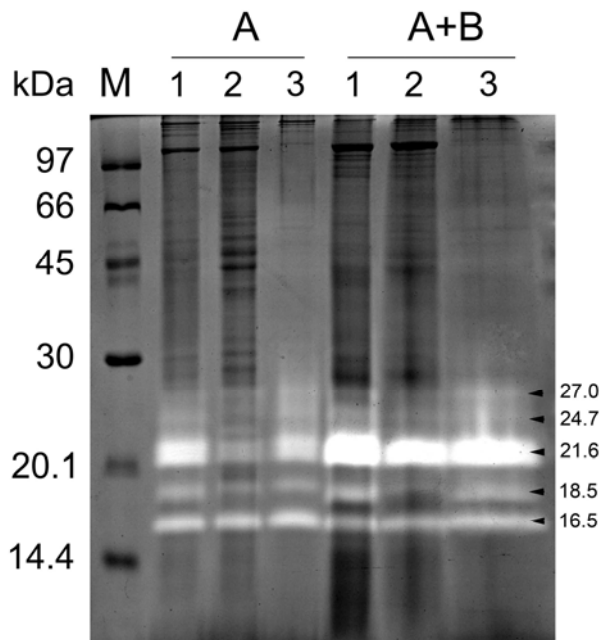


Figura 11. Zimogramas con sustrato caseína, muestra los extractos enzimáticos de larvas de *Artemia* obtenidas bajo cultivo gnotobiótico expuesta a la bacteria *Exiguobacterium mexicanum* 8N. A = *Artemia* en cultivo axénico, A+B = *Artemia* en cultivo monoxénico con *E. mexicanum* 8N. 1 = Sin inhibidor, 2 = Con inhibidor TLCK para tripsinas, 3 = Con inhibidor PMSF para serin proteasas.

2.4. DISCUSIÓN

2.4.1. Proteasas extracelulares de bacterias

Muchas especies de bacterias han sido reconocidas por tener la capacidad de volver biodisponible el alimento usado para organismos acuicultivados, mediante el aporte de enzimas digestivas. Especies de bacterias del género *Bacillus* spp., han sido reportadas al presentar dicha actividad catabólica utilizando enzimas proteasas extracelulares, no obstante la producción de estas proteasas fue influenciada por la disponibilidad del sustrato apropiado y las condiciones ambientales (Ochoa-Solano y Olmos-Soto, 2006; Esakkiraj et al., 2007). Hay otros estudios relacionados a las bacterias del lumen intestinal de organismos acuáticos marinos que mostraron digestión potencial del alimento consumido por el huésped (Donachie y Zdanowski, 1998, Esakkiraj et al., 2007). Donachie y Zdanowski (1998) encontraron que las bacterias aisladas del lumen intestinal del crustáceo marino “krill” *Euphasia superba* tuvo significativamente más actividad de lipasas (C14), proteasas tipo tripsina, y fosfatasa ácida que las bacterias aisladas del agua de mar, cuando son determinadas con el producto Api Zim system™. Donachie y Zdanowski mencionaron que estos resultados pueden apoyar la tesis de la existencia de una actividad metabólica bacteriana en el lumen intestinal de *E. superba*. En otro estudio, fue demostrado que las proteasas extracelulares de la bacteria *Bacillus cereus* fueron moderadamente halofílicas; dicha bacteria fue aislada del lumen intestinal del pez *Mugil cephalus* y presentó alta actividad específica de 15 U mg⁻¹ en un sustrato

con desechos de atún y una fuente optimizada de carbón y nitrógeno (Esakkiraj et al., 2007).

2.4.2. *Microbacterium* sp., 8L

Nuestros resultados demostraron la producción de proteasas extracelulares por la bacteria benéfica *Microbacterium* sp. 8L y estas tuvieron una más alta actividad ($P > 0.05$) cuando son comparados con las SPEs de las otras cepas de bacterias evaluadas (Tabla II). Ha sido reportado que otra especie de *Microbacterium* sp. (cepa AR-68) aislada de un lago salado alcalino, produce un alto nivel de proteasas alcalinas, aparentemente del tipo serin proteasas, ya que ellas tuvieron una actividad enzimática residual reducida en la presencia de PMSF 1 mM al 4 %. Estas proteasas mostraron una amplia resistencia a condiciones extremas y mantuvieron 85 % de su actividad a 60 °C durante 1 h de incubación y fueron estables en pH con rango de 5 a 12 (Gessesse and Gashe, 1997). En nuestro trabajo la actividad de proteasas determinada en los zimogramas con las SPEs de ambas bacterias *Microbacterium* sp. cepa 8L y cepa 8R (Figura 6) revelaron solo una banda de actividad de 28 kDa, la cual no correspondió a ninguna enzima del tipo serino, debido a que no fueron afectados por los inhibidores PMSF y TLCK. Otros autores han reportaron proteasas extracelulares diferentes al tipo serino en bacterias del genero *Microbacterium*. Kanayama y Sakai (2005) caracterizaron de *M. liquefaciens* una metaloendopeptidasa (EC 3.4.24) de 21 kDa, probablemente una proteína dependiente de Zn no inhibida por PMSF 20 mM. Aunque degrada gelatina no es una gelatinasa (EC 3.4.24.24, EC 3.4.24.35). Thys et al. (2006) obtuvieron de *Microbacterium* sp., cepa Kr10 una enzima con actividad queratinolítica

de 42 kDa. Ellos asumieron que fue una metaloendopeptidasa debido a que fue inhibida por EDTA 5 mM, y por 1-10-fenantrolina 1 mM, pero no por PMSF 5 mM.

2.4.3. *Exiguobacterium mexicanum* 8N

Una presunta serin proteasa (probablemente una quimiotripsina) producida por la bacteria Gram positiva *E. mexicanum* 8N tuvo una masa molecular de 24.0 kDa, la cual esta en el rango reportado para las serin proteasas alcalinas de bacterias de 15 a 30 kDa (Rao et al., 1998), este grupo de proteasas son producidas por varias bacterias Gram positivas (Rao et al., 1998, Kumar et al., 2004) y son activas a pH alcalino alto (Rao et al., 1998). El resto de las proteasas de la cepa 8N, con masa molecular de 56.6 y 61.0 kDa, son reportadas por primera vez para *Exiguobacterium* sp., y no fueron tripsinas, o serin proteasas.

El GH% de la proteína de levadura por las SPEs de todas las especies evaluadas fue observado en geles de SDS-PAGE durante 1 hora de reacción y pudo confirmar que las enzimas presentes en las SPEs poseen diferentes especificidades al sustrato y las diferentes proteínas son hidrolizadas a diferentes niveles (Figura 11). Los valores de GH% obtenidos de los ensayos con pH-stat para los tratamientos 8L y 8N no fueron diferentes ($P > 0.05$) (Tabla II), no obstante los geles de SDS-PAGE (Figura 11) de la hidrólisis de proteínas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mostraron una hidrólisis diferente como puede ser observado en las bandas de proteínas reveladas. Esto puede ser explicado debido a que las enzimas de las diferentes SPEs usadas presentan una especificidad diferente hacia el sustrato (la levadura). EL método pH-stat detecta cambios de pH en la mezcla de reacción. Se espera que estos cambios sean causados por

el incremento de los protones liberados (H^+) durante la hidrólisis de los enlaces peptídicos y son compensados por la adición de NaOH. El volumen de álcali añadido a la mezcla es usado para calcular el GH%. En la mezcla de reacción de enzima-sustrato, es probable que haya reacciones hidrolíticas diferentes de la proteólisis que puedan incrementar la acidez en la solución, por ejemplo *E. mexicanum* 8N tiene la capacidad hidrolítica para actuar sobre la N-acetil glucosamina (López-Cortés et al., 2006), la cual esta presente como un compuesto estructural de la pared celular de la *Saccharomyces cerevisiae* (Aguilar-Uscanda y François, 2003)

2.4.4. *Vibrio parahaemolyticus* 588 CECT

Las exoproteasas de *Vibrio* spp. generalmente han sido estudiadas por su patogenicidad (Aguirre-Guzmán et al., 2004; Häse and Finkelstein, 1993). Estudios previos de proteasas extracelulares de *V. parahaemolyticus* han sido proteasas tipo quimiotripsina (EC 3.4.21 serina endopeptidadas, EC 3.4.21.1 quimiotripsina), y colagenasa (EC 3.4.24 Metaloendopeptidasa, EC 3.4.24.3 colagenasa microbiana) (Aguirre-Guzmán et al., 2004; Ishihara et al., 2002; Lee et al., 2002; Miyoshi et al., 2008). Las proteasas extracelulares de 43.5 kDa y 51.3 kDa observadas en las SPEs de *V. parahaemolyticus* mostraron una masa molecular (determinada por SDS-PAGE) similar a otras enzimas reportadas en trabajos previos (Lee et al., 2002; Ishihara et al., 2002). La primera es una proteína monomérica extracelular de 43 kDa designada como proteasa A de *V. parahaemolyticus* No. 93. Fue inhibida por PMSF (a concentraciones de 1 y 10 mM), y por el inhibidor de tripsina de soya (0.1 mg mL^{-1}). Esta serin proteasa tuvo actividad citotóxica sobre células de mamífero y actividad óptima de 40 a 50 °C y pH 8.0. Aunque fue considerada ser una serin proteasa, mostró inhibición por el agente quelante de metales 1-10 fenantrolina a 20 mM, pero su actividad no fue restaurada por la adición

de iones de metales divalentes tales como Ca^{2+} y Zn^{2+} , como es mostrado por las metaloproteasas (Lee et al., 2002).

Otra proteasa extracelular de 50 kDa determinada en gel de SDS-PAGE fue designada como VPP1 y obtenida de la cepa clínica patógena *V. parahaemolyticus* KX-V137 (Ishihara et al., 2002). La proteasa purificada VPP1 resultó ser una serin proteasa calcio-dependiente debido a que fue inhibida por los quelantes de calcio EDTA y EGTA (1 mM), y también por los inhibidores de serin proteasas quimostatina y PMSF (Ishihara et al., 2002). Miyoshi et al. (2008) corroboró la amplia distribución de esta proteína VVP1 en especies de *V. parahaemolyticus* usando la cepa V98-401 y notó que es una proteasa tipo quimotripsina basado en los resultados de inhibición con quimostatina, obtenidos por Ishihara et al. (2002). Sin embargo, Miyoshi et al. (2008) encontró que la proteasa A de 43 kDa aislado por Lee et al. (2002), y la proteasa VVP1 de 50 kDa encontrados por Ishihara et al. (2002), fueron la misma serin proteasa, basado en la composición de las secuencias de amino ácidos n-terminal y en las respuestas a los inhibidores. La VVP1-proteasa A fue propuesta como una enzima colagenolítica complementaria o sustitutiva para las proteínas de 90 kDa y 68 kDa que son la expresión del gen colagenasa *vppC* en *V. parahaemolyticus* (Miyoshi et al., 2008). Por lo tanto, las proteasas extracelulares de *V. parahaemolyticus* 588 CECT mostrado en nuestro estudio tiene funciones probables como factores de virulencia, aunque la enzima de 51.3 kDa fue parcialmente inhibida con PMSF, un inhibidor de serin proteasas.

2.4.5. Funciones benéficas de proteasas diferentes a la digestibilidad

Otras funciones benéficas de las proteasas bacterianas con aplicación potencial en la acuicultura, además del catabolismo de proteínas, están relacionadas sus actividades antibacterianas (Aguirre-Guzmán et al., 2004; Faye et al., 2002; Than et al., 2004). Por ejemplo, enzimas proteolíticas extracelulares purificadas parcialmente de la bacteria marina *Pseudomonas* sp. A1-J25 con actividad en sustratos de caseína y azocaseína, inhibió el crecimiento de *V. parahaemolyticus* y mostró lisis celular causando la muerte de la bacteria. Esta proteasa tuvo una masa molecular > 20kDa (Than et al., 2004). Además, una enzima hidrolasa N-acil amino ácido de *Microbacterium arborescens* SE14 (aislada del tracto digestivo anterior de larvas de *Spodoptera exigua*), un monómero con 17.2 kDa, fue reportada por causar reacciones defensivas contra plantas durante la alimentación del insecto como un mecanismo de defensa indirecto (Ping et al., 2007). El probable antagonismo de las cepas bacterianas evaluadas en el presente trabajo, a través de enzimas extracelulares necesita ser determinado; sin embargo, ensayos previos en cultivos microbianos no apoyaron la probabilidad de presentar una actividad antagónica hacia la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* (dato no publicado).

2.4.6. Proteasas extracelulares bacterianas en el lumen intestinal de animales

acuáticos

El sistema metabólico en la actividad de proteasas extracelular de bacterias puede estar preparado para responder a la disponibilidad de sustratos, como fue visto para *Vibrio* sp., cepa S14 y *Pseudomona* sp., cepa S9. En la ausencia de sustrato (como células no

alimentadas por largo tiempo) la producción y/o liberación de proteasas extracelulares decreció. Sin embargo, la regulación de la actividad de proteasas extracelulares puede ser diferente entre las especies de bacterias (Albertson et al., 1990). Ringo et al. (2008), reportaron el género *Microbacterium*, y *Exiguobacterium*, asociados al lumen intestinal de pez marino como residentes naturales, ellos realizaron análisis de secuencias del gen 16S ARNr en poblaciones de bacterias cultivables presentes en el lumen intestinal del pez marino *Salmo salar*, y recuperaron especies cercanas a *Microbacterium oxidans* OUCZ46, y *Exiguobacterium artemiae* 9AN como bacterias autóctonas (adheridas al tejido de la pared intestinal), entre otras especies (Ringo et al., 2008). *E. artemiae* fue aislada de quistes de *Artemia franciscana*, así como también las especies evaluadas en este estudio *E. mexicanum* 8N (López-Cortés et al., 2006), y *Microbacterium* spp. Cepas 8L, y 8R (Orozco-Medina et al., 2002;). Ringo et al. (2008) encontraron que la presunta bacteria *M. oxidans* fue recuperada solo cuando los peces fueron alimentados con una dieta conteniendo polisacáridos de soya purificada sin almidón. En comparación, la especie *Exiguobacterium artemiae* 9AN, fue recuperada solo de peces alimentados con una dieta de carne de pescado con nivel insignificante de polisacáridos sin almidón. Estos datos y los resultados de nuestro estudio sobre proteasas extracelulares muestran evidencia de un probable papel enzimático diferente entre las cepas 8L y 8N en tránsito a lo largo del lumen intestinal de la *Artemia*.

Los extractos enzimáticos de *Artemia* con bacterias 8N en S-SDS-PAGE indicaron que dichas bacterias probablemente no aportan enzimas proteasas para la digestión de proteínas en un ambiente ligeramente alcalino, no obstante es probable que influyan en la expresión o en la actividad de las enzimas proteolíticas de la *Artemia*. En embriones y estadios larvarios tempranos de *Artemia* se ha detectado la proteasa

cisteína (EC 3.4.22 cisteína endopeptidasas) intracelular no lisosomal, que presenta alta actividad en pH ácidos, es una molécula heterodímera compuesta de un polipéptido catepsina tipo L de 28.5 kDa y un polipéptido denominado proteína asociada a catepsina L de 31.5 kDa con función aun no determinada (Liu y Warner, 2006). Las proteasas incrementan sus niveles de actividad durante la transición embriónica-larval de *Artemia*, y se sugiere que el pH ácido y el decremento en la concentración de ATP presente en los embriones quiescentes son factores de regulación de la proteólisis (breukelen y Han, 2000). Sillero et al. (1980) encontraron actividades proteolíticas en extractos de larvas de *Artemia*, obtenida de un ambiente natural, de 4 proteasas de larvas denominadas A, B, C, y D. Las 4 proteasas tuvieron alta actividad en un rango de pH alcalino. La proteína A de 30 kDa fue probablemente una quimotripsina por ser inhibida con PMSF e hidrolizar los enlaces éster leucina del sustrato CLNE. La proteína B de 33 kDa también resulto ser serin proteasa tipo quimotripsina, ya que hidrolizó el grupo amida del sustrato BAPNA el cual el grupo carboxil es aportado por arginina. Las proteínas C y D tuvieron un peso de 34 kDa, y 36 kDa (Sillero et al., 1980).

De las proteasas relacionadas en los procesos digestivos de crustáceos decápodos marinos las de mayor importancia pertenecen al tipo de las serin endopeptidasas (EC 3.4.21) y metaloendopeptidasas (EC 3.4.24) (Navarrete del Toro et al., 2006). La mayor actividad de las serin endopeptidasas se observa a pH de entre neutros a ligeramente alcalinos. Aunque enzimas con alta actividad a valores de pH ácidos como las aspártico endopeptidasas (EC 3.4.23) no son comunes en crustáceos (Gildbert, 1988), sin embargo existen reportes de la presencia de enzimas aspártico proteasas en crustáceos como en la langosta *Homarus gammarus* (Navarrete del Toro et al., 2006). Trabajos previos descartan la probabilidad de un importante aporte

enzimático exógeno bacteriano de proteasas con actividad ácida, como las aspárticas en crustáceos marinos (Donachie et al., 1995; Navarrete del Toro et al., 2006)

En invertebrados que producen membrana peritrófica (MP) del tipo II (secretadas por células epiteliales en la zona anterior del intestino medio como se presenta en *Artemia*) la digestión inicial ocurre en el lumen intestinal, además de presentar una compartimentalización enzimática digestiva ejercida por una MP con permeabilidad diferencial (Ferreira et al., 1994; Terra et al., 2001). Se ha determinado en larvas de *Rhynchosciara americana* (díptera) y *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) la ocurrencia predominante de enzimas del tipo tripsina y amilasa en el espacio luminal endoperitrófico, la aminopeptidasa y maltasa fueron encontradas solo en el espacio ectoperitrófico; a nivel del intestino medio con un pH alcalino de 9.3 a 9.8 (Ferreira et al., 1994; Terra et al., 2001). Estos resultados sugieren que la digestión inicial de proteasas en lumen intestinal endoperitrófico es una actividad digestiva importante en invertebrados con MP del tipo II. En *Artemia*, dado el caso de un ambiente alcalino en el lumen intestinal y la importancia de la digestión inicial de proteasas en el espacio endoperitrófico, el aporte de enzimas exógenas como las de *Microbacterium* 8L (bacteria transitoria luminal endoperitrófica) probablemente se una participación importante en la actividad metabólica de *Artemia*.

Nuestros resultados sugieren la liberación de oligo-péptidos en el lumen intestinal de *Artemia* por acción de las proteasas de *Microbacterium* cepa 8L sobre la proteína de levadura (Figura 7). Nishino y Nakayama (2006) también reportó un *Microbacterium* sp., como parte de un consorcio bacteriano útil para producir amino ácidos libres. *Microbacterium* sp., cepa 8L tiene la capacidad de crecer en un medio de cultivo axénico usando levadura esterilizada por autoclave *Saccharomyces cerevisiae*

como única fuente de proteína (Hipólito-Morales, 2005). Las proteasas extracelulares de bacterias *Microbacterium* sp. 8L y 8R de 28.0 kDa mostraron una gran capacidad para hidrolizar la proteína soluble de levadura en SDS-PAGE, comparado con las proteasas de *Exiguobacterium mexicanum* 8N DSM 16483^T and *Vibrio parahaemolyticus* 588 CECT. La gran capacidad de las enzimas exógenas de la bacteria *Microbacterium* 8L DSM 16485^T para hidrolizar las proteínas de levadura ha mostrado una probable contribución de esta bacteria en la biodisponibilidad de nutrientes de levadura cuando esta presente en el tracto digestivo de larvas de *Artemia*.

CAPÍTULO 3

Monitoreo de bacterias *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp., 8L en el tracto intestinal larvario del crustáceo *Artemia franciscana*, y de lubina Europea *Dicentrarchus labrax* bajo condiciones de cultivo agnotobiótico, mediante la técnica de TTGE

3.1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias *Microbacterium* sp., cepa 8L DSM 16485^T, y *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N DSM 16483^T, putativas probióticas para larvas de *A. franciscana*, han sido evaluadas bajo cultivos gnotobióticos mostrando un efecto positivo en su desarrollo y en el crecimiento de la larva (Orozco-Medina, et al. 2002). En el presente trabajo se determinó la presencia de estas bacterias 8L y 8N en el lumen intestinal de larvas de *A. franciscana* y *D. labrax* mediante análisis de geles de electroforesis con gradiente de temperatura temporal (TTGE), bajo condiciones de cultivo donde estuvieron expuestas al desarrollo fortuito de otras poblaciones bacterianas (cultivo agnotobiótico). Con el objetivo de determinar la influencia de estas bacterias en la comunidad bacteriana presente en el lumen intestinal larvario. Así como también la respuesta de las comunidades bacterianas en presencia de la bacteria patógena *Vibrio anguillarum* 01b (Kotzamanis et al., 2007) en larvas de *D. labrax*. La comunidad bacteriana presente en el tracto digestivo de las larvas fue determinada mediante análisis

por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de temperatura temporal (TTGE, temporal temperatura gradient gel electrophoresis), técnica que permite la separación de fragmentos parciales de secuencias del gen que codifica para el 16S ARNr bacteriano, con mismo tamaño pero diferente secuencia de nucleótidos (diferente entidad taxonómica), debido a las condiciones desnaturizantes generada en el gel por el incremento progresivo y constante de la temperatura, y la fuerza diferencial de unión covalente entre las bases nitrogenadas de la molécula de ADN, la cual es proporcional al porcentaje y distribución de GC en la secuencia. Los experimentos con cultivos agnotobióticos de larvas de *Artemia* expuestas a 8N y 8L permitieron conocer la influencia de dichas cepas sobre la comunidad bacteriana asociada al tracto digestivo de *Artemia*. Además, de determinar la capacidad de carga del tracto de *Artemia* en relación a las cepas de las bacterias 8N y 8L en el lumen intestinal, ya que las larvas nauplio de *Artemia* fueron posteriormente utilizadas como vectores o bioencapsulantes para suministrarlas a larvas de *D. labrax*, y fungiendo como alimento también. La capacidad protectora de las cepas 8N y 8L contra el patógeno *V. anguillarum* cepa 01b fue determinada en pruebas *in vivo* usando larvas de *D. labrax* de 6 y 16 días, como una determinación de su probable capacidad antagónica contra patógenos. Las preguntas planteadas en los siguientes experimentos fueron:

1. En condiciones agnotobióticas las bacterias 8N y 8L pueden estar presentes de manera activa dentro del tracto digestivo de larvas de *Artemia* y de *D. labrax*.
2. El suministro de estas bacterias en cultivos larvales pueden influir en la estructura de la comunidad bacteriana de su tracto digestivo, con y sin inclusión del patógeno *Vibrio anguillarum* cepa 01b.

3. Tienen las cepas 8N y 8L capacidad antagónica hacia patógenos en larvas de *D. labrax*.

4. Estas cepas tienen un aporte benéfico en la supervivencia y peso corporal de larvas de este pez.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Presencia y actividad de bacterias *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp., 8L por detección y expresión del gen del 16S ARNr, en el lumen intestinal de larvas de *Artemia franciscana*, y su influencia en comunidad bacteriana determinada por TTGE

3.2.1.1. Condiciones de cultivo larval de *Artemia*

Nauplios de *Artemia* cultivados en matraces cerrados, con 80 mL de agua de mar filtrada (filtro de 5 μm) a una densidad de 20 nauplios mL^{-1} , 25 °C de temperatura, e inyección inicial de gas O_2 durante 3 min, fueron expuestos 24 h a los siguientes tratamientos (con duplicado):

N) nauplios con bacterias 8N a concentración 10^8 bacteria mL^{-1} en el agua de cultivo,

n) nauplios con bacterias 8N con 10^7 bacterias mL^{-1} ,

L) nauplios con bacterias 8L con 10^8 bacterias mL^{-1}

l) nauplios con bacterias 8L con 10^7 bacterias mL^{-1}

Al medio de cultivo agnotobiótico se le añadió 10 mg de concentrado de lípidos autoemulsificantes SELCO que contiene ácidos grasos altamente insaturados omega -3, por cada unidad experimental (80 mL), en todos los tratamientos. Las unidades de cultivo fueron mantenidas con agitación constante. Al final del cultivo se determinó la supervivencia larval tomando muestras de 1 mL para el conteo bajo el estereo microscopio, determinando numero de nauplios mL^{-1} .

3.2.1.2. Concentración bacteriana cultivable aislada de lumen intestinal de *Artemia*

Al final del cultivo se tomaron 5 mL del medio de cada unidad en ambiente estéril dentro de la campana de flujo laminar, las larvas contenidas en las muestra fueron lavadas con 4.5 mL de agua de mar estéril, posteriormente se re-suspendieron en volumen igual de agua de mar estéril; 1 mL fue tomado para determinar numero de larvas mL^{-1} , y el resto fue homogenizado para su dilución serial en agua de mar estéril. De cada dilución se inoculó 100 μL en placa con medio de cultivo selectivo (elaborado en el laboratorio), y 1 mL en placa Petrifilm™ 3M 38-9018-1246-1 usadas para bacterias heterótrofas aerobias. El medio de cultivo selectivo para el desarrollo de la cepa 8N fue PS8+PS, compuesto por 2.35 g de PCA (Standard plate count agar, AES Laboratoire), 10 μg de polimixina, y 10 μg de Estreptomycin por mL, en 100 mL de agua de mar filtrada, a pH 7.8. El medio selectivo para la cepa 8L fue POO+P, compuesto por 2.35 g de PCA, y 10 μg de polimixina mL^{-1} , en 100 mL de agua destilada. Ambos medios selectivos fueron esterilizados por autoclave y vaciados en placas. A partir del conteo de colonias desarrolladas en placas con medio selectivo y en

Petrifilm, incubadas al menos durante 6 días a 32 °C y 25 °C respectivamente, se determinó el número de unidades formadoras de colonia presente en cada larva de *Artemia* (UFC de bacterias/Larva). Debido a las características fenotípicas de la colonia de las cepas 8N y 8L, se pudo determinar el conteo específico en placas con medio selectivo.

3.2.1.3. Extracción de ARN y ADN total presente en larvas de *Artemia*

Las larvas de *Artemia* que restaron en cada unidad de cultivo al muestreo bacteriano, fueron concentradas en filtro de 150 µm de diámetro de malla y lavadas con agua de mar estéril, y se dividieron en dos porciones iguales, una porción de larvas fue suspendida en tubo Eppendorf de 2 mL con 500 µL de solución TRIZOL™ SIGMA T9424 para su posterior extracción de ARN, y la segunda porción de larvas fue suspendida en 200 µL de tiocianato de guanidina SIGMA G6639 para la extracción de ADN.

Extracción de ARN. El procedimiento de extracción de ARN esta basado en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). A cada tubo con larvas de *Artemia* y 500 µL de trizol™, fue vertido 500 µL de perlas de vidrio y agitado en vortex por 10 min, después se añadió 200 µL de cloroformo y agitó con lentitud. Se centrifugó a $12000 \times g$ por 15 min a 4 °C, para de inmediato tomar la fase superior acuosa colocándola en un tubo nuevo de 1.5 mL; se añadió 250 µL de isopropanol y dejó a 25 °C por 10 min, y se centrifugo nuevamente por 10 min para luego volver a tomar el sobrenadante y añadir 500 µL de etanol al 75 % frío, se agitó lentamente por unos segundos y se centrifugó a $7500 \times g$ por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue descargado

para dejar secar el tubo durante 1 h 30 min a 25 °C en ambiente estéril. El material precipitado en los tubos fue suspendido con 100 µL de agua libre de RNAsa, e incubado por 10 min a 60 °C. El tubo se almacenó una noche a 4-10 °C, para posteriormente determinar la pureza del ARN de transferencia mediante la determinación de la absorbancia de luz ultravioleta o densidad óptica (D.O.) en espectrofotómetro, una tasa $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ de ARNt puro tiene un valor ≥ 1.7 unidades de absorbancia. Se determinó la concentración de ARNt ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mediante la formula $(\text{D.O. } \lambda_{260})(40) (1 \times \text{grado de dilución})$, donde D.O. λ_{260} = la densidad óptica a 260 nm de longitud de onda; 40 = factor en la cual 1 unidad de D.O. $\lambda_{260} \text{ mL}^{-1}$ corresponde a 40 μg de ARNt mL^{-1} ; 1 \times grado de dilución = la dilución en la que se encuentra la muestra, en este caso se utilizaron muestras sin diluir de 1 µL. Posteriormente se hicieron alícuotas (triplicados) de 1 µg de ARNt en tubos de PCR para su uso posterior en el RT-PCR. El resto del material de ARNt fue precipitado con 0.1 volumen de acetato de potasio 2 M pH 5, y 2 volúmenes de etanol absoluto (95 %). Los tubos fueron almacenados a -50 °C (ver diagrama en Figura 12).

Extracción de ADN. El procedimiento de extracción de ADN esta basado en el método desarrollado por Godon et al. (1997). El volumen en tubos con larvas de *Artemia* fue ajustado a 250 µL con tiocianato de guanidina, para posteriormente añadir 40 µL de sarcosina N-Lauril SIGMA L9150 al 10 % en agua destilada, y 500 µL de sarcosina N-Lauril al 5 % en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8 (9.32 mL Na_2HPO_4 : 14.2 g en 100 mL H_2O , 0.68 mL NaH_2PO_4 (1M): 12 g en 100 mL H_2O , 90 mL H_2O). Se agitó brevemente en vortex e incubó en baño caliente a 70 °C durante 1 h. Se añadió 500 µL de perlas de vidrio 0.1 mm SIGMA G4649, y agitó por 10 min en vortex para el rompimiento de tejido. Se agregó 15-20 mg de solución de poly-vinilpirrolidona

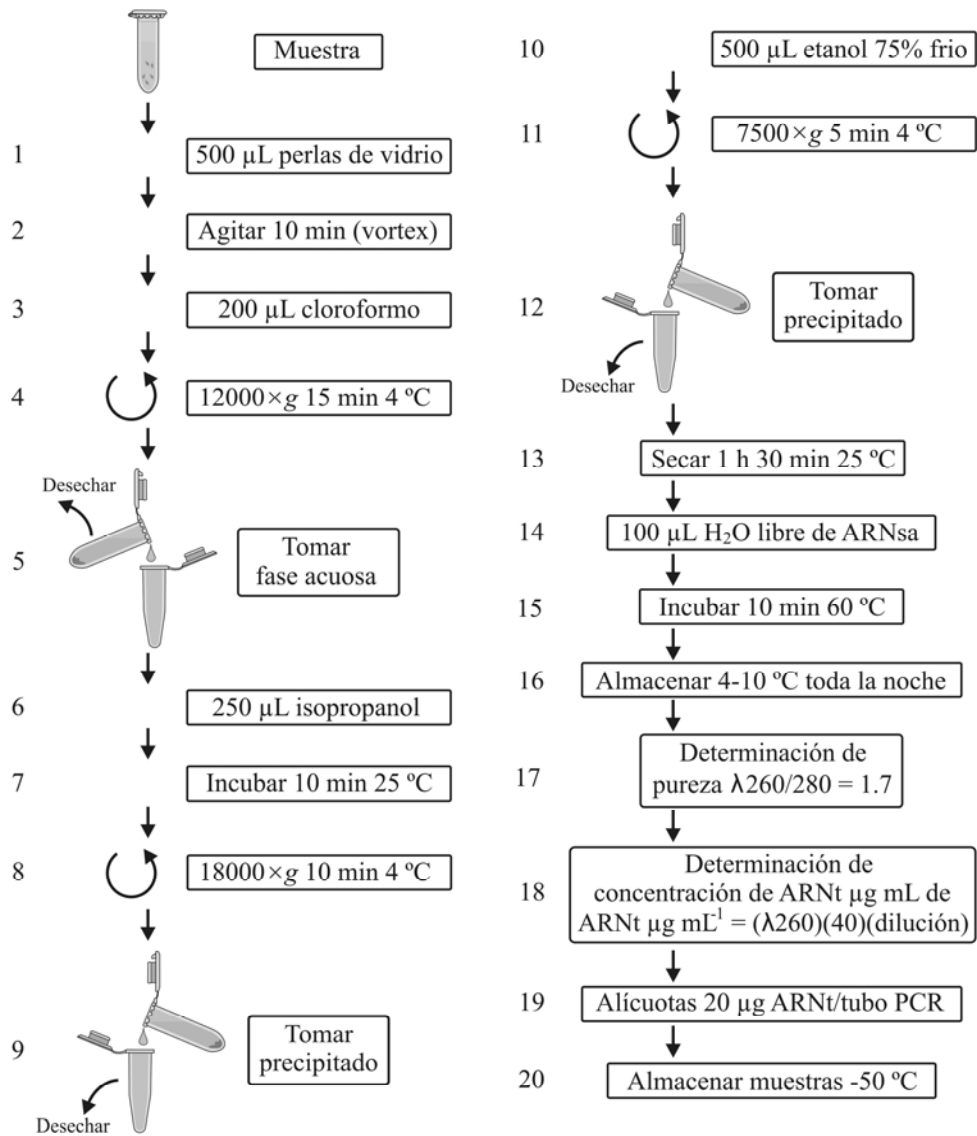


Figura 12. Diagrama de flujo para la extracción de ARNt de bacterias en tracto digestivo de larvas de *Artemia franciscana* y *Dicentrarchus labrax* por el método de TrizolTM, basado en Chomczynski y Sacchi (1987). \curvearrowright = Centrifugar.

(PVPP) SIGMA P6755, y agitó nuevamente en vortex unos segundos. La solución fue centrifugada a $18000 \times g$ por 3 min, para luego recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo de 2 mL. Al tubo con el remanente de perlas de vidrio se agregó 500 μL de solución TENP (270 mg de PVPP, 540 μL de NaCl 5 M, 1080 μL EDTA 0.5 M, 1350 μL Tris 1 M) y se suspendió con vortex brevemente, para nuevamente centrifugar a $18000 \times g$, 3 min y recuperar el sobrenadante, el cual es vertido en el anterior tubo con el primer sobrenadante, este último proceso se repitió dos veces más hasta alcanzar un volumen aproximado de 2 mL de sobrenadante (en esta etapa las muestras pudieron ser almacenadas toda la noche a 4-10 °C).

El volumen total de sobrenadante fue separado en dos volúmenes, y a cada tubo de Eppendorf (1.5 mL) con sobrenadante fue añadido 1 mL de de isopropanol (2-propanol), para dejarlo 10 min a 25 °C (o toda la noche a 4 °C), posteriormente se centrifugó a $18000 \times g$ 5 min y para luego ser descargado el sobrenadante; los tubos se dejaron secar en ambiente aséptico durante 1 h, para agregarse 450 μL de solución amortiguadora de fosfatos a cada tubo, y 50 μL de acetato de sodio 3 M. Las soluciones resultantes fueron mezcladas y unidas en un solo tubo, al tiempo que se dejó en hielo durante al menos 1 h 30 min. Se centrifugó a $18000 \times g$ 30 min a 4 °C, y el sobrenadante recuperado en un tubo nuevo de 1.5 mL se le agregó 2 μL de RNAsa SIGMA R6513 (10 mg mL⁻¹) y mezcló en vortex gentilmente, para a continuación incubar de 1-2 h a 37 °C. Al final de la incubación se colocó en hielo para añadir 50 μL de acetato de sodio SIGMA S7545, y 1 mL de etanol al 100 %, y el tubo fue almacenado a -20 °C por 20 min. Las muestras fueron centrifugadas a $18000 \times g$ 3 min a 4 °C, descargado el sobrenadante se agregó 750 μL de etanol al 75 % y agitó en vortex brevemente, para nuevamente centrifugar, se repite la operación con 500 μL de etanol

75 %. Al final el sobrenadante fue descargado y los tubos secados en ambiente aséptico por 1 h 30 min. Una vez deshidratados los tubos, se añadió 20 μL de agua destilada estéril y se dejó reposar por 2 h a 25 °C para la elusión del ADN, y después fue conservado a -20 °C. El ADN extraído fue el utilizado como templado para la amplificación del gen que codifica para el 16S ARNr de eubacterias. Para determinar la pureza y concentración de ADN se determinó la absorbancia de luz ultravioleta o densidad óptica (D.O.) en espectrofotómetro, donde la tasa $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ de ADN tiene un valor ≥ 2.0 unidades de absorbancia. Se determinó la concentración de ADN ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mediante la formula (D.O. λ_{260}) (50) (1/grado de dilución), para luego hacer alícuotas (triplicados) de 50 μg de ADN en tubos de PCR para su posterior amplificación. Los tubos fueron almacenados a -20 °C (ver diagrama en Figura 13).

3.2.1.4. Extracción de ADN de bacterias en cultivo axénico

Los amplicones del 16S ADN de las bacterias 8N, 8L, y *V. anguillarum*, usados como referencias en geles de TTGE, fueron obtenidos de bacterias cultivadas en placas de agar marino 2216. La biomasa bacteriana fue tomada con asa bacteriológica y puesta en suspensión con 200 μL de “buffer” de lisis (10 μL de Tris HCl 10 mM pH 7.8 SIGMA T3038, 20 μL EDTA 1 Mm, 10 μL Triton X-110 1 % SIGMA T8787, 960 μL agua destilada estéril). La mezcla fue colocada en baño con agua en ebullición por 5 min, y luego se añadió 200 μL de cloroformo; esta solución fue centrifugada a $14000 \times g$ 1.5 min y la fase acuosa fue tomada. La operación de separación por cloroformo se repitió

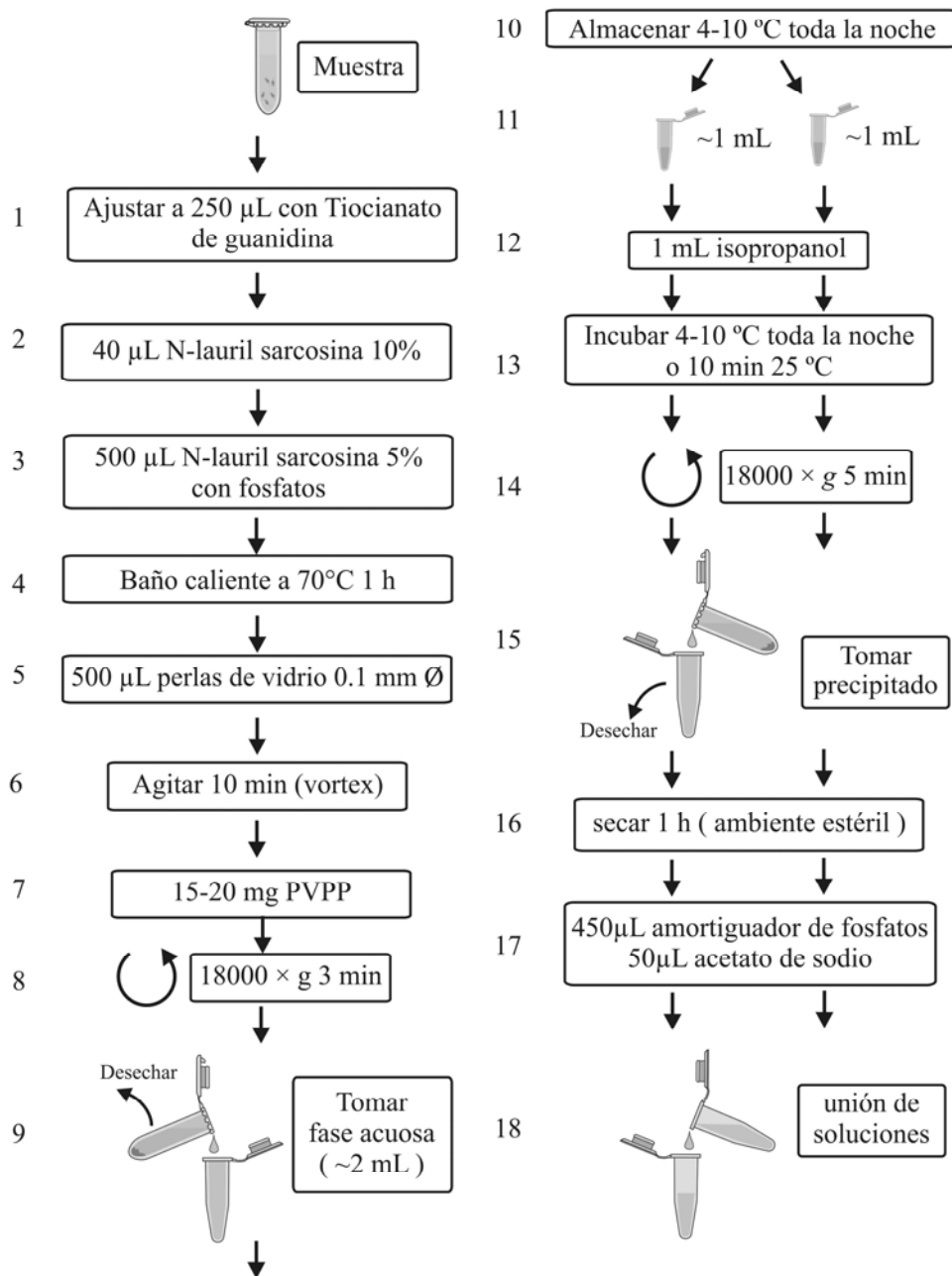


Figura 13 (1 de 2). Diagrama de flujo para la extracción de ADN de bacterias en tracto digestivo de larvas de *Artemia franciscana* y *Dicentrarchus labrax*, basado en el método descrito por Gordon et al. (1997). \curvearrowright = Centrifugar.

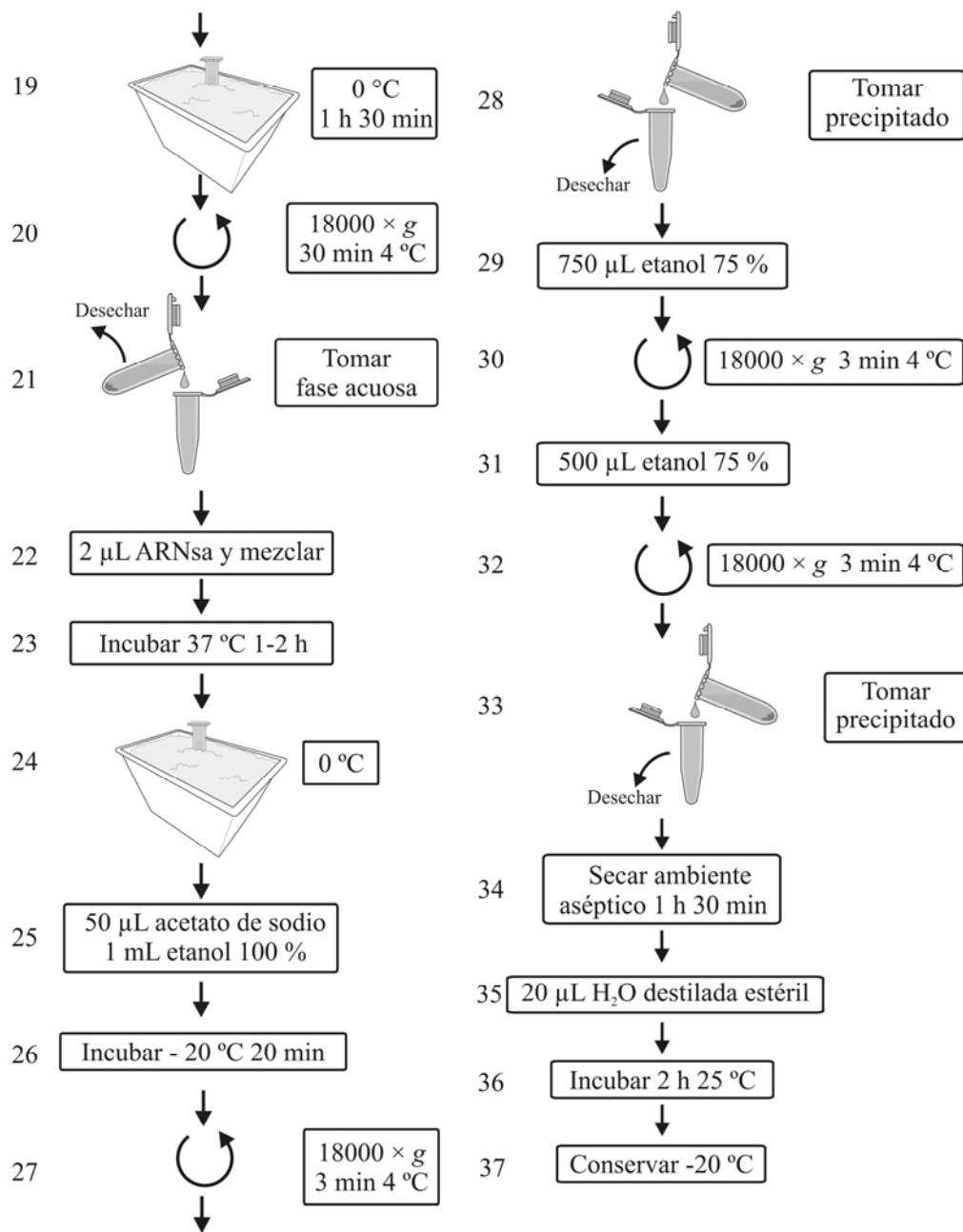


Figura 13 (2 de 2). Diagrama de flujo para la extracción de ADN de bacterias en tracto digestivo de larvas de *Artemia franciscana* y *Dicentrarchus labrax*, basado en el método descrito por Gordon et al. (1997). = Centrifugar.

al menos una vez para obtener una mayor pureza de ADN. También se cuantificó la concentración del material de ADN mediante el procedimiento arriba descrito.

3.2.1.5. RT-PCR de ARN extraído de larvas de *Artemia*

El ARN contenido en Tubos de PCR con alícuotas de 1 µg, fue el templado para la reacción de transcripción por la enzima reversa-transcriptasa (RT-PCR). Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) por RT-PCR se utilizó el producto comercial Quanti Tec Reverse Transcription Kit QUIAGEN No. 205311. El procedimiento llevado a cabo fue el sugerido en el manual de uso de dicho producto, para obtener 20 µL de volumen de reacción final con producto del RT-PCR, dicho producto (ADNc) fue almacenado a -20 °C, para su posterior uso como templado para la amplificación del gen del 16S ARNr de eubacterias.

3.2.1.6. Amplificación del 16S ADNr de eubacterias en tracto intestinal de *Artemia*

Muestras de ADN genómico, y ADN complementario obtenido de larvas de *Artemia*, fueron utilizadas como templado para la amplificación parcial del gen que codifica para el fragmento ribosomal 16S de eubacterias. Los iniciadores utilizados fueron el 341Forward con un segmento rico en GC en el extremo 5' (CGC-CCG-CCG-CGC-CCC-GCG-CCC-GTC-CCG-CCG-CCC-CCG-CCC-GCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG), y el 907 Reverse (CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT). Los componentes y concentraciones de la mezcla de reacción que se utilizó se muestran en la tabla III. El programa de amplificación en termociclador TECHNE TC-512 fue: Un ciclo a 94 °C 3

min para la desnaturalización inicial; 30 ciclos a 94 °C 1 min de desnaturalización, 59 °C 1 min de alineación o hibridación, 72 °C 2 min de elongación; y un ciclo final de elongación a 72 °C 7 min.

Tabla III. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación (PCR) parcial del gen 16S ribosomal de eubacterias en larvas agnotobióticas de *Artemia* y *D. labrax*.

Reactivos	Vol. 1x	4x	8x	Concentración
	(volumen mínimo)	(50 µL)	(100 µL)	final
H ₂ O libre de RNAsa	8.725	39.4	69.8	
MgCl ₂ (25 mM)	0.75	3.0	6	1.5 mM
dNTPs Eurogenetec (20 mM)	0.5	2	4	0.8 mM
Amortiguador p/PCR 10x	1.25	5.0	10	1x
Iniciador 341 F + cola GC (100 µg mL ⁻¹)*	0.4375	1.75	3.5	0.0035 µg µL ⁻¹
Iniciador 907 R (100 µg mL ⁻¹)	0.15	0.6	1.2	0.0012 µg µL ⁻¹
Taq. Polimerasa (5U µL ⁻¹)	0.03125	0.125	0.25	0.0125 U µL ⁻¹
AmpliTac Stoffel	0.03125	0.125	0.25	
Templado de DNA (20 ng µL ⁻¹)	0.625	2.5	5	0.001 µg µL ⁻¹
Volumen total	12.5	50	100	

* La diferencia de volumen entre los iniciadores en la mezcla de reacción, se debe a la diferencia de peso molecular, el iniciador forward 341 con cola de GC tiene un peso molecular mayor al iniciador reverse 907 R en una proporción de 2.8:1 aproximadamente.

3.2.1.7. Electroforesis en gel desnaturizante con temperatura temporal (TTGE)

Los productos amplificados por PCR del gen 16S ribosomal de bacterias en tracto digestivo de las larvas, fueron separados por diferencias en las secuencias nucleotídicas mediante la técnica de TTGE.

Los geles de TTGE fueron preparados de la siguiente manera. Gel de separación: En tubo cónico de 50 mL, se mezclaron 16.8 g de Urea 7 M, y 19.4 mL de agua destilada, se disolvió con calor para luego añadir 800 μ L de amortiguador TAE 50x (para obtener concentración final de 1x), posteriormente se agrega 6 mL de bis acrilamida 6 % 37:5:1 (Bio-Rad) y disuelve bien para pasar a través de filtro de 0.2 μ m de diámetro de poro, al final se afora a 40 mL con agua destilada y conserva a 4 °C (en hielo); para la polimerización del gel se agregan 245 μ L de APS al 10 %, y 42 μ L de TEMED. Gel de concentración o de carga: Se disolvió 100 μ L de TAE 50x, 750 μ L de bis acrilamida 6 % 19:1, 50 μ L de APS 10 %, 12 μ L de TEMED, y aforado a 5 mL con agua destilada.

Una vez montado el gel dentro del tanque del sistema de TTGE, el buffer TAE 1x que embebe el gel es calentado a 65 °C. Las muestras son cargadas en el gel en mezcla con buffer de carga (Eurobio GEPELPOO-OD 017513) en proporción 2:1. La electroforesis inicial fue corrida a 20 Volts por 30 min y el resto del tiempo a 60 Volts (con \sim 28-55 mA). La tasa de elevación de temperatura fue 0.3 °C h⁻¹ a una temperatura inicial de 63.4 °C, para terminar en un tiempo de 22 h.

El gel de TTGE es embebido en una solución preparada con 20 μ L del agente de tinción de ADN Sybr Green (Invitrogen S-7567) y 200 mL de TAE 1x, protegido de la incidencia de luz y tomando medidas de seguridad recomendadas para el manejo del

Sybr Green. El gel se mantuvo con agitación constante durante 30 min en la oscuridad y el excedente de la solución de tinción fue lavado con 200 mL de TAE 1x con agitación constante por 15 min en la oscuridad también. El gel es foto-documentado a través de un transiluminador a 300 nm. Las bandas de ADN observadas en los geles de TTGE fueron analizadas usando el programa GelCompar II Ver. 4.6TM, y los análisis de las comunidades bacterianas presentes como perfiles de bandas de ADN o unidades taxonómicas operacionales fueron realizados utilizando el programa PAST Ver. 1.67 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

3.2.2. Presencia y actividad de bacterias *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp., 8L por detección y expresión del gen del 16S ARNr, en el lumen intestinal de larvas de lubina Europea *Dicentrarchus labrax*, y su influencia en la comunidad bacteriana determinada por el método de TTGE

3.2.2.1. Condiciones de cultivo larval de *D. labrax*

Los experimentos fueron hechos en cultivos agnotobióticos usando tanques cónicos con 35 L de agua de mar filtrada y 2000 larvas de lubina Europea *D. labrax* (~ 57 larvas L⁻¹) en etapa D6 de desarrollo post-eclosión. Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad a 15 °C. Se evaluaron 3 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, de la siguiente manera

C. Cultivo control, sin la adición de las bacterias 8N y 8L

N. Cultivo larval con el suministro de 8N bioencapsulada través de nauplios de *Artemia*

L. Cultivo larval con el suministro de 8L bioencapsulada través de nauplios de *Artemia*

Los tanques de cultivo estuvieron distribuidos de manera aleatoria. El alimento vivo *Artemia* fue suministrado continuamente a las larvas de lubina en todos los tratamientos, a través de una bomba peristáltica a una densidad total de 5 larvas mL⁻¹ en un día. Los nauplios de *Artemia* con o sin las bacterias 8N u 8L bioencapsuladas (bacterias contenidas en el tracto digestivo de *Artemia*, las que a su vez fueron suministradas como alimento a las larvas lubina) se contuvieron en un tanque distribuidor de 5 litros. La encapsulación de bacterias en nauplios de *Artemia* se hizo en tanques cónicos con 5 litros de agua de mar filtrada y nauplios a una densidad de 50 nauplios mL⁻¹. Fue añadido 125 mg L⁻¹ de un concentrado de lípidos autoemulsificantes conteniendo ácidos grasos poli-insaturados SELCOTM a nauplios de *Artemia* usados para todos los tratamientos; en tratamientos correspondientes (N y L) se añadió biomasa bacteriana respectiva al agua de cultivo de bioencapsulación, la cantidad tal para obtener una densidad de 1×10^6 bacterias mL⁻¹. El cultivo se mantuvo a 25 °C y una aireación constante durante 24 h para obtener larvas de *Artemia* bioencapsuladas listas para ser suministradas a larvas de lubina. Los cultivos se mantuvieron durante 19 días alcanzando una edad de 24 días de post-eclosión. Al final del experimento se tomaron muestras de 30 larvas de cada unidad de cultivo (repetición) y embebidos en una solución fijadora de fenol (a una proporción 1:1 con agua). Se dejó actuar el proceso de fijación de larvas durante al menos 30 días para posteriormente determinar el peso húmedo de larvas. Se contaron todas las larvas supervivientes de cuatro repeticiones de cada tratamiento al final del cultivo. Larvas presentes en la quinta repetición restante de cada tratamiento fueron utilizadas para realizar las pruebas posteriores de reto con el patógenos *V. anguillarum*, descritas en las secciones 3.2.3. y 3.2.4.

3.2.2.2. Extracción de ARN y ADN total presente en larvas de *D. labrax*

Al final del cultivo larvario de *D. labrax*, se tomaron muestras de 10 larvas de cada unidad de cultivo para la extracción de ADN, y 10 larvas para la extracción de ARN, y se suspendieron en 200 μ L de solución TrizolTM. Las larvas fueron homogenizadas en condición estéril previo al proceso de extracción de ácidos nucleicos. El proceso de extracción de ADN y ARN que se llevo a cabo fue como el descrito arriba para larvas de *Artemia* (sección 3.2.1.3).

3.2.2.3. RT-PCR de ARN extraído de larvas de *D. labrax* de 24 días de post-eclosión (dpe)

El proceso para la amplificación y síntesis de ADN complementario a partir del ARN mediante la transcripción inversa (RT-PCR), fue llevado a cabo conforme al descrito anteriormente para las larvas de *Artemia* (sección 3.2.1.5).

3.2.2.4. Amplificación del 16S ADN_r de eubacterias en tracto intestinal de *D. labrax*

Las muestras de ADN genómico y ADN complementario del 16S_r de bacterias en tracto digestivo de larvas de *D. labrax*, fueron procesadas para su amplificación según fue descrito previamente para las muestras de larvas de *Artemia* (sección 3.2.1.6).

3.2.2.5. TTGE de bacterias en tracto digestivo de larvas de *D. labrax*

Los productos de PCR del ADN codificante para el fragmento ribosomal 16S de bacterias presentes en tracto digestivo de larvas de *D. labrax*, fueron sometidos a la técnica de TTGE mediante el procedimiento descrito arriba para larvas de *Artemia* (sección 3.2.1.7).

3.2.3. Efecto de la presencia del patógeno *Vibrio anguillarum* 01b sobre la actividad de la comunidad bacteriana en lumen intestinal de *Dicentrarchus labrax* de 6 dpe con inclusión de *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp., 8L

3.2.3.1. Condiciones de cultivo larval

Experimentos con cultivos agnotobióticos de larvas de la lubina europea *D. labrax* con 6 dpe de edad. Las unidades de cultivo fueron de 0.25 larvas mL⁻¹ en botellas cerradas con 440 mL de agua de mar filtrada, mantenidas en la oscuridad a 20 °C, con inyección inicial de O₂ gaseoso en un tercio del volumen de capacidad de la botella. Los experimentos duraron 24 h. Los tratamientos con 6 repeticiones cada uno fueron los siguientes:

C. Cultivo control sin inoculación de bacterias

N. Cultivos inoculados con la bacteria 8N

NV. Cultivos inoculados con las bacterias 8N y *V. anguillarum*

L. Cultivos inoculados con la bacteria 8L

LV. Cultivos inoculados con las bacterias 8L y *V. anguillarum*

V. Cultivos inoculados con la bacteria *V. anguillarum*

Las bacterias 8N y 8L fueron inoculadas al inicio de la prueba, y la bacteria *V. anguillarum* fue inoculada a las 24 h de cultivo. Las bacterias fueron inoculadas para obtener una concentración en el agua de cultivo de 1×10^6 bacterias mL⁻¹. La prueba fue terminada a las 24 horas de inoculación de la bacteria *V. anguillarum*. Se tomaron larvas (las mayores posibles) de 3 repeticiones de cada tratamiento como muestra para la extracción de ARN.

3.2.3.2. Extracción, amplificación del 16Sr ADN y TTGE de larvas de 6 dpe en reto con bacterias *V. anguillarum*, 8N, y 8L

Los procesos previamente descritos en secciones anteriores de extracción de ARN, amplificación del gen 16Sr ARN bacteriano, y TTGE, fueron aplicados en muestras de larvas obtenidas en los tratamientos de la presente prueba de 24 h en reto con la bacteria patógena *V. anguillarum* y las bacterias 8N y 8L.

3.2.4. Efecto de la presencia del patógeno *Vibrio anguillarum* 01b sobre la supervivencia y comunidad bacteriana intestinal de *Dicentrarchus labrax* de 16 dpe con inclusion de *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp., 8L

3.2.4.1. Condiciones de cultivo larval de *D. labrax*

Larvas de *D. labrax* de 16 dpe de edad cultivadas bajo los tratamientos C, N, y L en la sección 3.2.2., fueron tomadas de 3 unidades de cultivo respectivamente para ser transferidas a botellas con 400 mL de agua de mar filtrada con 100 larvas cada una (250 larvas L⁻¹), con 12 repeticiones de cada tratamiento. Las botellas se mantuvieron en oscuridad a 20 °C. Al inicio de la prueba de reto se añadieron las bacterias 8N y 8L en los respectivos tratamientos N y L a una concentración de 1×10^6 bacterias mL⁻¹. A las 24 h de la prueba de exposición se añadió la bacteria *V. anguillarum* a una concentración de 1×10^6 bacterias mL⁻¹ en los tres tratamientos de C, N, y L. Se mantuvo la prueba de reto durante 4 días sin alimento. Al final de la prueba se determinó la supervivencia y se tomaron muestras de larvas para la extracción de ADN y ARN.

3.2.4.2. Extracción, amplificación del 16Sr ADN y TTGE de larvas de 16 dpe en reto con bacterias *V. anguillarum*, 8N, y 8L

Los procesos previamente descritos en secciones anteriores para la extracción de ADN y ARN, la amplificación RT-PCR de ARN, la amplificación del gen 16Sr ARN bacteriano, y la TTGE, todos fueron aplicados en muestras de larvas obtenidas en los

tratamientos de la presente prueba de 4 días en reto con la bacteria patógena *V. anguillarum* y las bacterias 8N y 8L.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Presencia y actividad de bacterias 8N y 8L en lumen intestinal de *Artemia*

Los nauplios de *Artemia* a 24 h de exposición a las bacterias 8N u 8L en medio de cultivo con dos concentraciones (baja a 10^7 y alta 10^8 bacterias mL^{-1}), mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los medios de recuperación de bacterias PetriFilm™ y por siembra en medio selectivo, el medio PetriFilm™ mostró mayores concentraciones de bacterias de entre log 4.3 a 5 UFC larva⁻¹ de *Artemia*, sin mostrar diferencias entre concentraciones de bacterias altas y bajas en medio de cultivo, en cambio el medio selectivo logró recuperarse hasta dos niveles de magnitud menor de UFC larva⁻¹ con la bacteria 8N (Tabla IV). La bacteria 8L mostró un significativo aumento en la concentración de UFC larva⁻¹ en tratamiento con alta concentración de bacterias (L). Las bacterias heterótrofas viable recuperadas por PetriFilm™ pertenecen estadísticamente a las bacterias 8L ($P < 0.05$) recuperadas por medio selectivo, con una recuperación de log 4.6 - 4.7 UFC larva⁻¹ (Tabla IV).

Tabla IV. Cuenta bacteriana en lumen intestinal de nauplios de *Artemia* a 24 h de cultivo agnotobiótico en base a medios de cultivo PetriFilm™ y medio selectivo. Valores logaritmos de UFC larva⁻¹, media ± desviación estándar (n=2). N = Nauplios con alta concentración de bacteria 8N, n = con baja concentración de bacterias. L = Nauplios con alta concentración de bacteria 8L, l = con baja concentración de bacterias. C = nauplios sin bacterias 8N y 8L.

	N	n	L	l	C
Petriefilm™	4.9 ± 0.3 ^b	5.0 ± 0.2 ^b	4.7 ± 0.3 ^b	4.3 ± 0.3 ^b	4.8 ± 0.3
Medio selectivo	3.5 ± 0.2 ^a	2.9 ± 0.2 ^a	4.6 ± 0.3 ^b	3.3 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0

Diferentes letras en superíndice indican diferencia significativa entre rangos de: a < b < c < d, a una $P < 0.05$ (Prueba de Kruskal-Wallis).

Los perfiles de TTGE de bacteria en lumen intestinal de *Artemia* a las 26 h de exposición a las bacterias 8N y 8L con alta y baja concentración en el medio de cultivo, mostraron la señal de presencia y de actividad celular de la banda correspondiente a 8N en ambas concentraciones (Figura 14). La señal de actividad bacteriana de 8N fue más evidente en tratamientos con alta concentración bacteriana que en tratamiento con baja concentración. En tratamientos con 8L bandas de presencia y actividad aunque débiles fueron difícilmente perceptible en ambas concentraciones (Figura 14). Análisis de similitudes DICE en comparaciones con tratamientos control, los tratamientos con 8N mostraron en perfiles de presencia (PCR) y de actividad (RT-PCR) valores menores de similitud (PCR 0.6, RT-PCR 0.7) comparados a los obtenidos con la bacteria 8L que se mostraron cercanos en similitud con tratamientos control (PCR 0.8, RT-PCR (0.8 – 0.9) (Tabla V).

Tabla V. Análisis de similitudes por el índice de DICE de las comunidades bacterianas desarrolladas en cultivos agnotobióticos de *Artemia*, comparando tratamiento control con los demás tratamientos (N y n = alta y baja concentración de bacteria 8N, L y l = alta y baja concentración de bacteria 8L). En base a la presencia de ácidos nucleicos genómico (16S ADNr) y complementario (16S ARNr) extraídos de los nauplios de *Artemia*, indicadores de presencia y de actividad bacteriana, respectivamente.

Análisis	Tratamientos	16S ADNr	16S ARNr
DICE	N vs C	0.57	0.67 – 0.71
	n vs C	0.67	0.80 – 0.86
	L vs C	0.8	0.83 – 0.86
	l vs C	0.8	0.92

3.3.2. Presencia y actividad de bacterias 8N y 8L en el lumen intestinal de larvas de *Dicentrarchus labrax*

Larvas de peces de 24 días de post-eclosión (dpe) de edad cultivadas con *Artemia* como alimento y como bioencapsulantes de las bacterias 8N y 8L, mostraron que los tratamientos con la bacteria 8L (L) no revelaron la presencia y actividad bacteriana de su banda correspondiente (Figura 15). Los tratamientos con 8N (N), no mostraron la señal de presencia ni de actividad bacteriana de 8N; no obstante, en tratamientos de 8N con

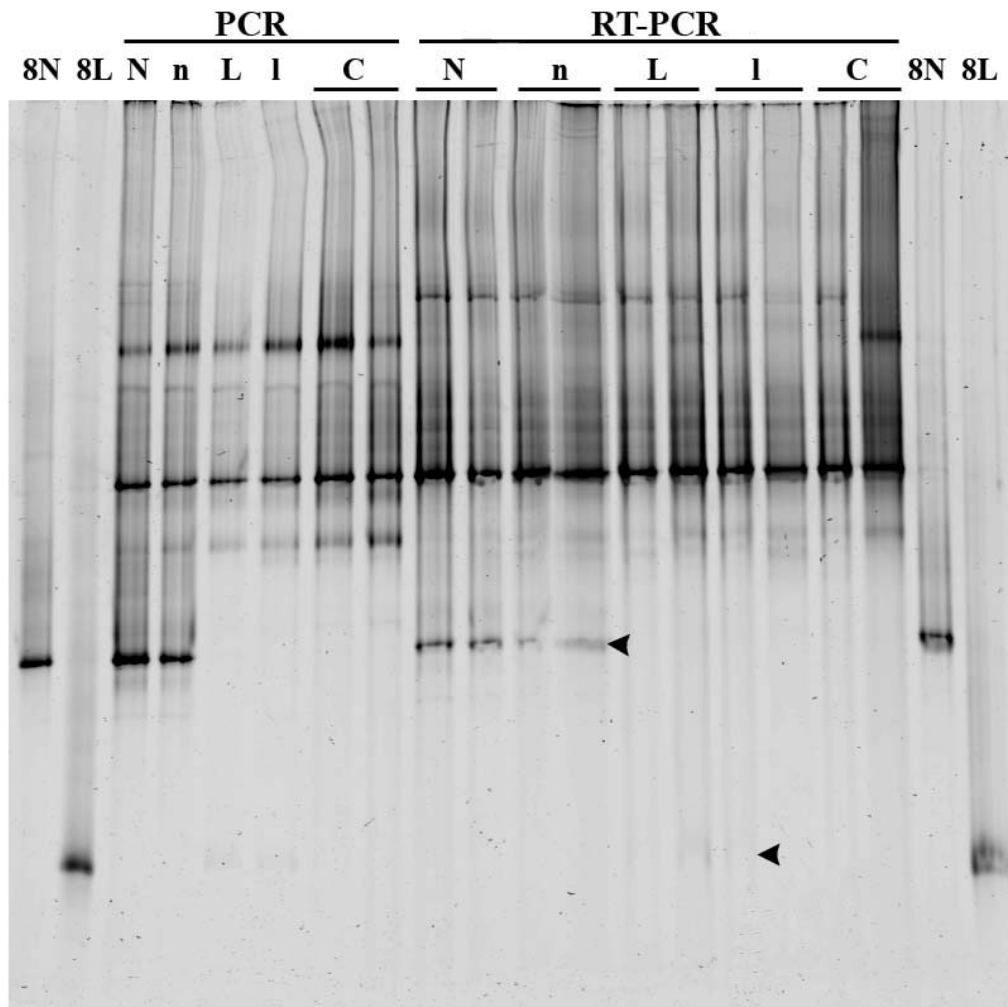


Figura 14. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias presentes en el lumen intestinal de *Artemia nauplio* expuesta 24 h a las cepas bacterianas 8N y 8L a concentraciones de 10^7 bacteria mL^{-1} (8N = n, 8L = l), y 10^8 bacterias mL^{-1} (8N = N, 8L = L). Los productos amplificados de ADN genómico (PCR) y ADN complementario (RT-PCR) fueron obtenidos a partir de ADN y ARN total extraídos de *Artemia nauplio*. Las flechas indican presencia activa de la cepa 8N y señal presuntiva de 8L.

actividad celular se presentó una banda de actividad en las réplicas 1 y 2, no observada en los demás tratamientos (Figura 15). Las larvas de *D. labrax* a los 19 días de cultivo

(24 dpe de edad) tuvieron peso húmedo total en el tratamiento control 4.41 ± 0.12 g, en tratamiento con 8L 4.47 ± 0.14 g, y en tratamiento con 8N 4.83 ± 0.15 g (Figura 16). El peso corporal de larvas obtenido con la bacteria 8N no muestran una diferencia significativa (ANOVA, $P < 0.05$) con respecto a los tratamientos control y con la bacteria 8L (Figura 16), aun cuando presentó a larvas con el mayor peso corporal de entre los tratamientos. La supervivencia entre los tratamientos Control, N, y L al final del cultivo no mostraron una diferencia significativa (ANOVA, $P < 0.05$, $n = 4$). Los cultivos Control tuvieron una supervivencia de $76 \% \pm 4.2$, los cultivos con la bacteria 8N $62 \% \pm 12$, y los cultivos con 8L $64 \% \pm 9.4$ (Figura 16).

3.3.3. Actividad de las bacterias 8N y 8L en el lumen intestinal de *Dicentrarchus labrax* de 6 dpe expuesta a un reto con el patógeno *Vibrio anguillarum* 01b

Pruebas de actividad bacteriana con detección de ARNr por TTGE en el lumen intestinal de *D. labrax* en reto con *V. anguillarum* y las cepas 8N y 8L, mostraron una banda muy tenue correspondiente a la cepa 8N en su condición activa con y sin la adición de *V. anguillarum*. En los tratamientos con 8L no reveló actividad celular en ambos casos sin *V. anguillarum* (L) y con *V. anguillarum* (L+V) (Figura 17). Análisis de similitud DICE mostraron que los tratamientos sin *V. anguillarum* tuvieron un perfil de bandas con mayor similitud comparado con el tratamiento control (C vs N = 0.8, C vs L = 0.7), que la similitud del control comparado con los tratamientos donde se inoculó *V. anguillarum* (C vs C+V = 0.6, C vs L+V = 0.6), excepto en tratamiento de

8N con *V. anguillarum* (C vs N+V = 0.7). *V. anguillarum* no se determinó activo en el gel de TTGE (Figura 17).

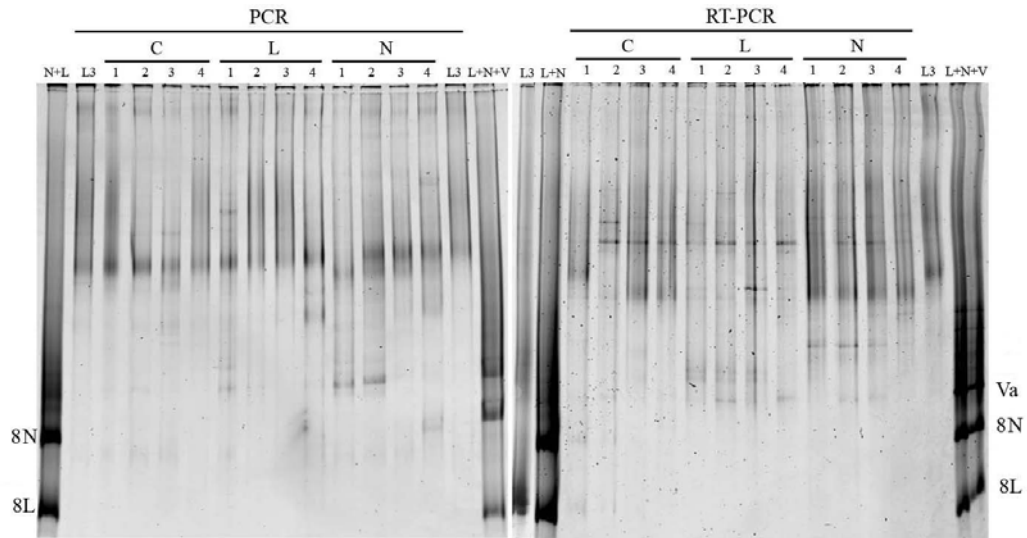


Figura 15. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias obtenidas por amplificación de ADN genómico (PCR) y ADN complementario (RT-PCR), a partir de ADN y ARN extraído de lumen intestinal de larvas de *Dicentrarchus labrax* a 19 días de cultivo (24 dpe). C = tratamiento control sin bacterias 8N y 8L, L = tratamiento con 8L, N = tratamiento con 8N.

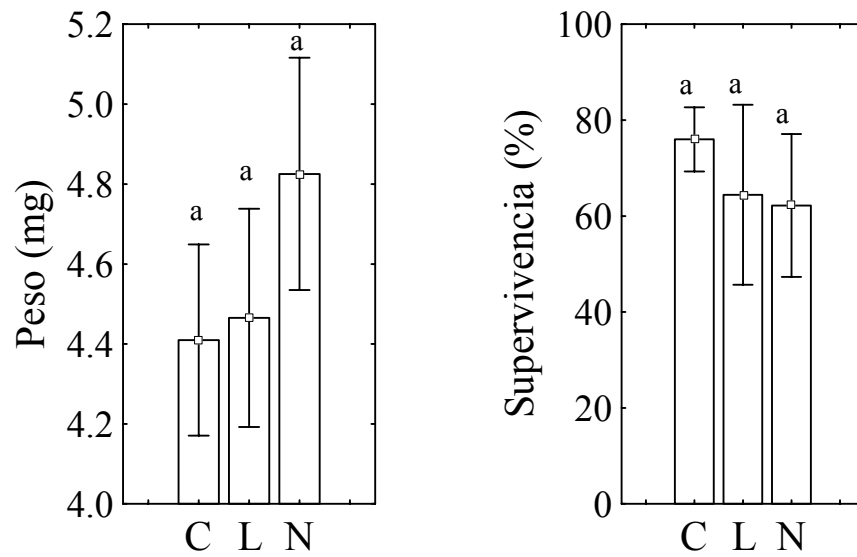


Figura 16. Peso y supervivencia de larvas de *Dicentrarchus labrax* a los 19 días de cultivo (24 dpe). C = tratamiento control sin bacterias 8N y 8L, L = tratamiento con 8L, N = tratamiento con 8N. Letras sobre las columnas indican diferencia significativa entre los tratamientos: $a < b$ a $P < 0.05$ (Prueba de Tukey). Líneas verticales en las barras muestran intervalos de confianza para las medias con 95 % de confianza.

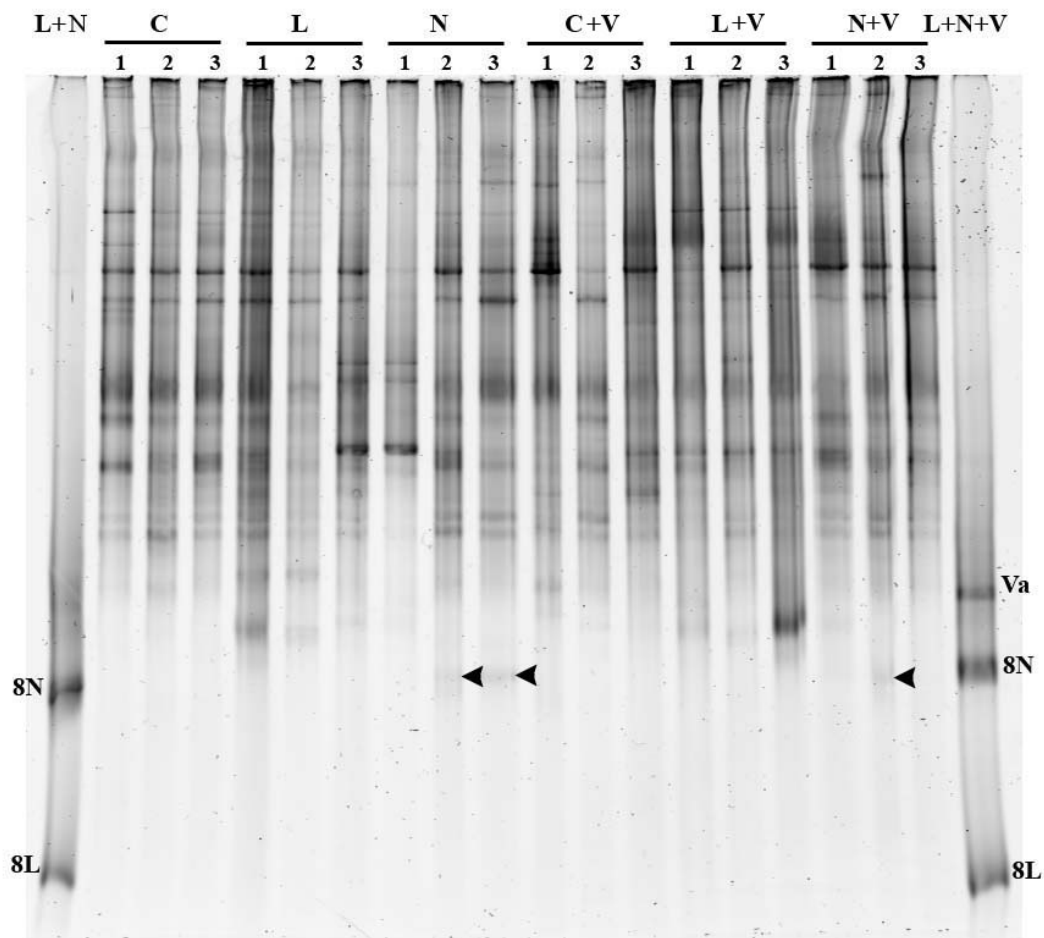


Figura 17. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias obtenidas por amplificación de ADN complementario (RT-PCR), a partir ARN extraído de lumen intestinal de larvas de *Dicentrarchus labrax* con 6 días de post-eclosión (dpe) de edad expuestas a *Vibrio anguillarum* 01b durante 24 h. C = tratamiento control sin bacterias 8N, 8L y *V. anguillarum*, L = tratamiento con 8L, N = tratamiento con 8N, C+V = tratamiento con *V. anguillarum*, L+V = tratamiento con 8L y *V. anguillarum*, N+V = tratamiento con 8N y *V. anguillarum*. Flechas indican una señal presuntiva de la bacteria 8N.

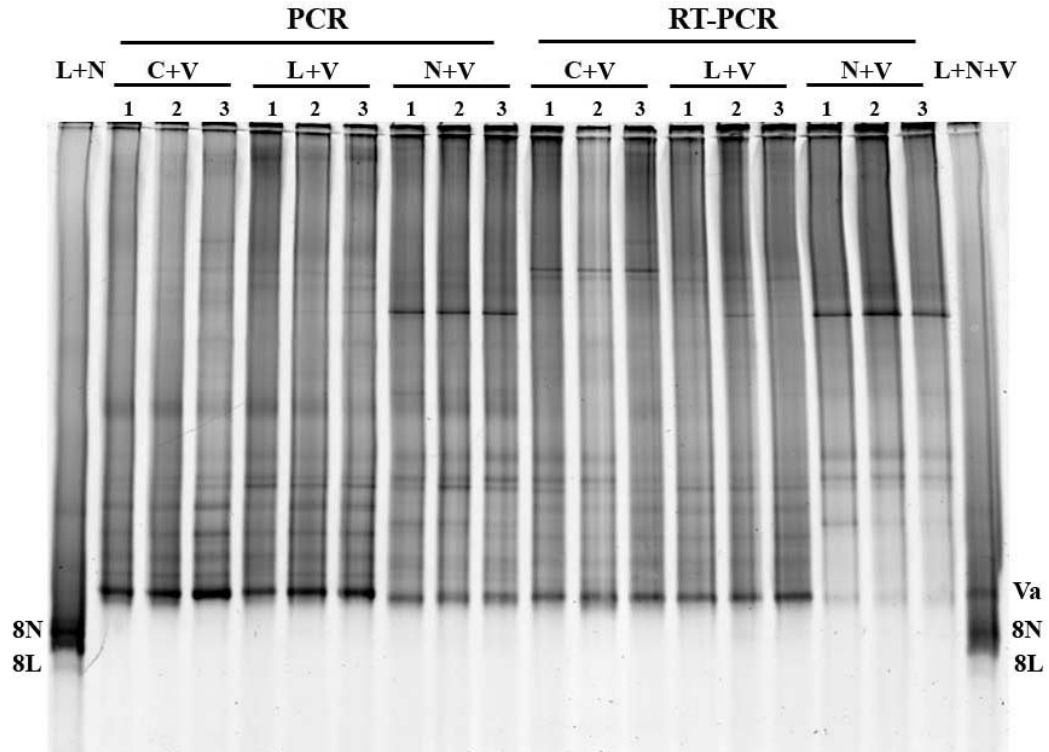


Figura 18. Perfiles de TTGE del gen parcial del 16S ARNr de bacterias obtenidas por amplificación de ADN genómico (PCR) y ADN complementario (RT-PCR), a partir de ADN y ARN extraído de lumen intestinal de larvas de *Dicentrarchus labrax* con 11 días de cultivo (16 dpe) de los tratamientos C, L, y N, y posteriormente expuestas a *Vibrio anguillarum* 01b durante 4 días sin alimentación. C+V = larvas de cultivos sin inóculo previo de bacterias más *V. anguillarum*, L+V = larvas de cultivos con previo inóculo con bacteria 8L más *V. anguillarum*, N+V = larvas de cultivos con previo inóculo con bacteria 8N más *V. anguillarum*.

3.3.4. Presencia y actividad de las bacterias 8N y 8L en lumen de *Dicentrarchus labrax* de 16 dpe en reto con el patógeno *Vibrio anguillarum*

En tratamientos con las bacterias 8N y 8L no se observó la señal de presencia y de actividad celular correspondiente para estas bacterias en la TTGE. La señal para *V. anguillarum* estuvo presente (PCR) y con actividad (RT-PCR) en todos tratamientos (Figura 18). En tratamientos con 8N (N+V) se evidenció una señal de presencia y actividad de una entidad bacteriana no revelada en tratamientos control (C+V) ni tratamientos con 8L (L+V). La señal de actividad celular de *V. anguillarum* se observó reducida de manera evidente en los tratamientos con 8N (N+V) (Figura 18).

La supervivencia de las larvas a los 4 días de exposición al patógeno *V. anguillarum* fue comparada estadísticamente entre los tratamientos con la prueba de Tukey. Se determinó que la supervivencia del tratamiento de control C+V de 22 % comparada con la supervivencia del tratamiento L+V de 28 % (con la bacteria 8L) fueron estadísticamente similares, sin embargo la supervivencia de las larvas con la bacteria 8N (N+V) de 2 % resultó significativamente diferente comparada con los tratamientos control (C+V) y con la bacteria 8L (L+V) ($P > 0.05$) (Figura 19).

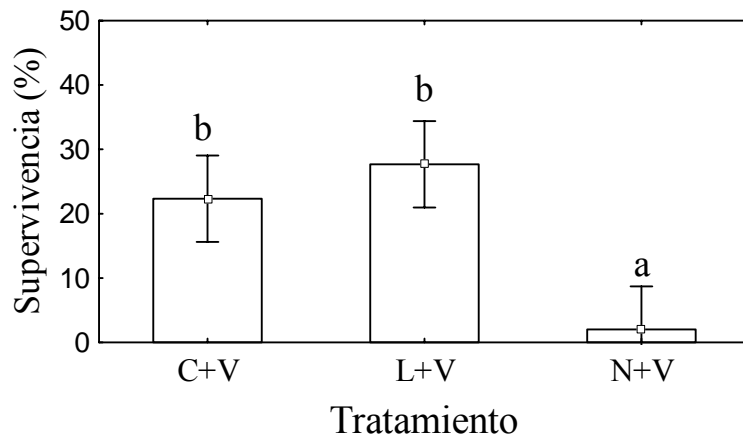


Figura 19. Supervivencia de larvas de *Dicentrarchus labrax* con 16 días de post-eclosión de edad expuestas al patógeno *Vibrio anguillarum* 01b durante 4 días. C+V = larvas de cultivos sin inóculo previo de bacterias, L+V = larvas de cultivos con previo inóculo con bacteria 8L, N+V = larvas de cultivos con previo inóculo con bacteria 8N. Letras sobre las columnas indican diferencia significativa entre los tratamientos: a < b a $P < 0.05$ (Prueba de Tukey). Líneas verticales en las barras muestran intervalos de confianza para las medias con 95 % de confianza.

3.4. DISCUSION

3.4.1. Bacterias 8N y 8L en lumen intestinal de *Artemia*

Maeda et al. (1994) mencionan que ecosistemas acuícolas no pueden soportar una concentración mayor a 10^6 bacterias mL^{-1} por cada población en la comunidad bacteriana. Gómez-Gil (1998), determinó que la inoculación en cultivos larvales de camarones peneidos con altas concentraciones de bacterias (10^7 bacteria mL^{-1}) raramente resultaron en niveles de concentración mayores a los obtenidos al tiempo de

la inoculación, por al contrario decrecieron a las 72 h. En el presente estudio de bacterias 8N y 8L en cultivos agnotobióticos de larvas nauplio de *Artemia* se aplicaron dos concentraciones de bacterias, una alta (10^8 bacteria mL^{-1}) y una baja (10^7 bacteria mL^{-1}), sin embargo no evaluamos la concentración de bacterias resultante en el agua de cultivo posteriormente. Gómez-Gil et al. (1998) obtienen una máxima concentración de bacterias bioencapsuladas por nauplios de *Artemia* de 4.77×10^3 UFC nauplio⁻¹ en medio de cultivo agar soya triptica (TSA) o agar marino 2216, usando la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* HL57 inoculada al medio de cultivo con una concentración de 1.5×10^8 de UFC mL^{-1} . Verschuere et al. (2000a) obtienen una bioencapsulación (le llama colonización) de log 4.70 UFC nauplio⁻¹ con *Vibrio proteolyticus* CW8T2, el valor máximo obtenido de entre otras especies seleccionadas de bacterias con capacidad protectora contra este patógeno *V. proteolyticus*. En el presente estudio, los valores de concentración bacteriana en tratamientos con las bacterias 8N (log 4.9) y 8L (log 4.7) en la concentración alta, por el método de recuperación con medio PetriFilm™, resultaron cercanos a los obtenido por Gómez-Gil et al. (1998) y similares a los obtenidos por Verschuere et al. (2000a), ambos de *Vibrio* spp. Sin embargo, en nuestros resultados de recuperación bacteriana, es probable que una proporción de estas bacterias recuperadas no pertenezcan a las cepas 8N y 8L, como se pudo observar en los resultados obtenidos de concentración de bacterias mediante los medios selectivos (8N log 3.5, 8L log 4.6).

Se han realizado estudios sobre comunidades de bacterias asociadas a *Artemia* recuperadas de ambientes naturales (Straubb et al., 1993) y de cultivos agnotobióticos (Austin y Allen, 1982; Gorospe y Nakamura 1996). Verschuere et al. (1997) monitorearon las comunidades bacterianas en cultivos agnotobióticos de *Artemia* mediante cultivos en placa, y observaron que poblaciones bacterianas con estrategia

ecológica *r* (bacterias de crecimiento rápido observado con una producción de colonias visibles a dos días de incubación) predominaron en el tracto digestivo (61 %) y superficie de *Artemia* (91 %), desde las 36 h de cultivo. También utilizaron placas de micro-titulación Biolog GN para análisis de diversidad funcional de la comunidad bacteriana, y determinaron una diversidad alta pero sin diferencias significantes a diferentes tiempos de cultivo (35, 84, 132 h) entre 18 tanques de cultivo; mencionaron que sus resultados revelaron que la comunidad bacteriana estuvo determinada por factores determinísticos (por ejemplo: salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, composición del alimento) y factores estocásticos (por ejemplo: microorganismos remanentes después de la sanitización en el agua de cultivo, en las paredes de las unidades de cultivo, y en el aire circundante). En nuestros resultados obtenidos de la comunidad bacteriana en nauplios de *Artemia* a 24 h de cultivo revelaron en base a observaciones en TTGE que la adición de la cepa 8N al agua de cultivo puede representar una diferencia en la estructura de la comunidad bacteriana, y en menor medida la cepa 8L. La débil señal de presencia y actividad de 8L en cultivos de *Artemia* se explica probablemente en base a la predominancia de poblaciones de bacterias con estrategias de crecimiento *r* en cultivos de *Artemia* (Verschuere et al., 1997), pues la cepa 8L ha mostrado crecimiento colonial lento en medio líquido 2216 con tasa constante de crecimiento ($K =$ duplicaciones que ocurren en la población bacteriana por hora) de 0.13 h^{-1} , comparado con la cepa 8N con $K = 0.23 \text{ h}^{-1}$ (Orozco-Medina, 2001), esta última a su vez con crecimiento estimado más lento comparado a cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con duplicaciones generacionales de 3.7 a 4.4 veces h^{-1} (Ulitzur, 1974).

Verschuere et al. (2000a) estudiaron el control de comunidades bacterianas en cultivos agnotobióticos de *Artemia* para la protección contra la bacteria patógena *Vibrio proteolyticus* CW8T2, mediante la colonización preventiva de bacterias seleccionadas en los cultivos. Distinguieron dos categorías de protección en la supervivencia de *Artemia*, bacterias con protección total LSV4 (*Moraxella* sp.), LSV8 (Vibrionaceae), LSV9 (Vibrionaceae), y bacterias con protección parcial LVS1 (*Kurthia* sp.), LVS2 (*Kurthia* sp.), LVS5 (*Alcaligenes* sp.), LVS7 (*Nocardia* sp.). En nuestros cultivos agnotobióticos con *Artemia* no se determinó la capacidad protectora de las cepas 8N y 8L contra patógenos *Vibrio* sp., en base a observaciones de supervivencia larval, sin embargo observaciones de supervivencia sin patógenos mostraron un estimado de una decena de larvas inactivas en el fondo de las unidades de cultivo sin distinción entre los tratamientos incluyendo controles sin las bacterias 8N y 8L (todas las larvas fueron utilizadas para los análisis de TTGE), lo que podría indicar una inocuidad en cultivo agnotobiótico.

3.4.2. Bacterias 8N y 8L en lumen intestinal de *Dicentrarchus labrax*

Estudios de Gateosupe et al. (1997) con larvas tempranas de lubina *D. labrax* de 20 días de edad, observaron que la formulación de la dieta tiene efectos en la microbiota presente en la larva, basado principalmente en el suministro de hierro, a mayor aporte de sales ferrosas en la dieta se incrementó la carga bacteriana (10^9 UFC g⁻¹ peso corporal) con dominio de una cepa de *Vibrio* sp. Las bacterias aisladas de larvas de *D. labrax* alimentadas con *Artemia* fueron evaluadas para determinar la producción de enzimas extracelulares proteasas, fosfolipasas, lipasas, y α -amilasas, y observaron que

todas las cepas que produjeron proteasas, fosfolipasas, y/o amilasas fueron identificadas como *Vibrio*, y un 23 % pertenecieron a *Acinetobacter*, Enterobacteriaceae, y *Pseudomonas*, determinaciones basadas en características fenotípicas diagnosticas usando el producto comercial Api 20E y otras pruebas bioquímicas. La cepa dominante no produjo lipasas, en cambio esta actividad de lipasas se presentó en más del 80 % de las cepas aisladas de larvas alimentadas con *Artemia*. Gatesoupe et al. (1997) sugirieron mayor investigación respecto a la participación de exoenzimas bacterianas en la actividad digestiva de larvas de *D. labrax*. Nuestros resultados mostraron la presencia de una cepa bacteriana en todos los tratamientos pero no fue identificada. En cambio la presencia activa de la cepa 8N dentro del tracto digestivo de *D. labrax* de 24 días de edad, pudo influir en la comunidad bacteriana, particularmente en la expresión de la actividad bacteriana de una cepa en particular no detectada en los tratamientos control y con 8L (Figura 10). Las bacterias 8N y 8L suministradas en cultivos de larvas de *D. labrax* podrían ser consideradas inócuas en base a los resultados similares estadísticamente de supervivencia y ganancia de peso corporal comparados a los resultados obtenidos con larvas sin la presencia de estas cepas 8N y 8L. Un posible aporte benéfico bacteriano mediante exoenzimas, y nutrientes esenciales es probable que ocurra con la presencia y actividad de la cepa 8N en las larvas de *D. labrax*: El aporte de exoenzimas de bacterias ha sido sugerido por Gatesoupe et al. (1997) como una vía de la comunidad bacteriana con alta actividad de exoenzimas para generar un beneficio, en base a resultados de bacterias aisladas de larvas de *D. labrax*.

Durante el desarrollo larval de *D. labrax* la comunidad bacteriana presente en el tracto digestivo ha sido influenciada o derivada de la comunidad de acompañamiento en la dieta (Gatesoupe et al. 1997; Grisez et al. 1997); sin embargo, no ha sido determinada

una colonización dominante y persistente en el intestino por ninguna de las especies de bacterias observadas durante el desarrollo larval antes de la maduración del sistema digestivo (Grisez et al. 1997). Los datos del presente trabajo mostraron que la bacteria 8N es capaz de permanecer activa en el tracto digestivo de larvas de *D. labrax* a través de su bioencapsulación en larvas de *Artemia* usada como alimento.

En la prueba de actividad de las bacterias 8N y 8L en lumen intestinal de *D. labrax* de 6 días de edad en reto con el patógeno *Vibrio anguillarum*, solo la cepa 8N pudo ser detectada a través del TTGE, pero no la cepa 8L. Similar resultado fue obtenido en evaluaciones de DGGE de ingesta de estas bacterias por larvas de *Artemia* en cultivos gnotobióticos, donde solo la señal de la cepa 8N pudo ser detectada, aun cuando Orozco-Medina et al. (2008), reportaron la presencia y viabilidad de las células de 8L fueron determinadas positivas por microscopía electrónica de barrido y por microscopía de fluorescencia. En este trabajo de Orozco-Medina et al. (2008) sugirieron algunas posibles respuestas a la débil o nula señal de 8L con respecto a la cepa 8N en base a reportes previos, como la cantidad cepa-específica de ADN templado cuando es diferente genera productos de PCR en diferente proporción (Muyzer et al., 1993), el tamaño del genoma y organización de los genes del fragmento ribosomal 16S (Farrelly et al., 1995), y las limitaciones propias de la técnica que genera diversidad de comunidades bacterianas subestimadas comparadas a la técnica de librerías génicas (Kim et al., 2006). La cepa 8N se encuentra activa aun con la presencia del patógeno *V. anguillarum*, y la presencia de este patógeno influyó en la comunidad bacteriana con o sin las cepas 8N y 8L, pero en menor medida con la cepa 8N. Aun cuando fue evidente un cambio de la comunidad bacteriana en el tracto digestivo de larvas de 6 días con la

adición del patógeno *V. anguillarum*, la señal correspondiente a esta especie no fue detectada de manera evidente en la TTGE (Figura 12).

En geles de electroforesis de TTGE del tracto digestivo de larvas de *D. labrax* a 16 dpe de edad cultivadas bajo los tratamientos L (con cepa 8L), N (con cepa 8N) y control (sin 8L ni 8N) y puestas posteriormente en reto con *V. anguillarum* durante 4 días, la bacteria *V. anguillarum* se presentó dominante en la presencia y en la actividad de la comunidad bacteriana, pero no así en la actividad presente en el tracto digestivo de larvas con 8N (RT-PCR de N+V), en donde la señal débil de *V. anguillarum* en este tratamiento podría indicar una supresión de actividad bacteriana (Figura 13). No obstante, la baja supervivencia larval obtenida en el tratamiento con la cepa 8N (N+V) mostró que una falta de capacidad protectora para la larva contra el *V. anguillarum* 01b, en las condiciones experimentales expuestas (Figura 14). También se observó una probable capacidad de 8N para modificar la comunidad bacteriana del tracto digestivo de Larvas de *D. labrax* con la presencia y actividad de una cepa desconocida en los perfiles de TTGE tanto en esta prueba de reto con el *V. anguillarum* (Figura 13), como en cultivos de larvas de 24 días de edad alimentadas con *Artemia* (Figura 10). La cepa 8N en una condición oportunista pudo haber contribuido en la mortalidad larval debido a un probable debilitamiento del sistema inmune causado por la condición de ayuno de las larvas durante 4 días. Especies del género *Exiguobacterium* ha sido reportadas como bacterias oportunistas en organismo inmunodepresivos (Pitt et al., 2007). La cantidad de la bacteria patógena suministrada en las pruebas de reto para la evaluación de la capacidad protectora de bacterias probióticas en larvas sin alimentación necesita ser re-evaluada. Verschuere et al. (2000a) determinaron el rango apropiado de concentraciones bacterianas para infecciones experimentales de *Vibrio proteolyticus* CW8T2 en larvas

de *Artemia* bajo condiciones de alimentación y sin alimentación. Sus resultados mostraron que con alimentación todas las larvas murieron a las 48 h de infección sin importar la concentración bacteriana del patógeno (de 1×10^2 a 1×10^6 UFC mL⁻¹), y obtuvieron más rápida mortalidad con la más alta concentración. En infección experimental sin alimentación, el *V. proteolyticus* añadido a una concentración de 10^3 causó 30 % de mortalidad en *Artemia* a 24 h, y 93 % después de 48 h de inoculación; la cepa bacteriana seleccionada LVS8 24 h previamente inoculada a 5×10^6 UFC mL⁻¹ resultó con una mortalidad larval de menos de 23 % a 48 h de exposición a *V. proteolyticus* inoculada a 10^3 UFC mL⁻¹ (Verschuere et al., 2000). En las evaluaciones de capacidad protectora in vivo de las cepas 8N y 8L en larvas de *D. labrax* de 6 y 24 días de edad y sin alimentación contra el patógeno *Vibrio anguillarum*, se utilizó la concentración de 1×10^6 bacterias mL⁻¹ para inóculo de las cepas potenciales protectoras, y la misma concentración para la infección con la cepa patógena a las 24 h después. Es probable que la concentración de infección bacteriana en nuestras evaluaciones resultaron altas e inapropiadas para las evaluaciones de capacidad protectora de las cepas 8N y 8L y un tiempo demasiado prolongado de 4 días sin alimentación en larvas de *D. labrax* de 16 días de edad, ya que se registró una mortalidad cercana al 100 % con larvas previamente expuestas a la cepa 8N, y mayor del 50 % con la cepa 8L y en tratamiento sin esta bacteria (Figura 14).

3.4.3. Bacterias 8N y 8L y su condición benéfica en cultivos agnotobióticos

La determinación de niveles de ADN bacteriano en muestras naturales no se relaciona directamente con la viabilidad celular. En cambio la determinación de la viabilidad de

bacterias potencialmente probióticas o benéficas utilizando herramientas de detección de compuestos o indicadores de actividad celular bioquímica como la producción de ARNr, la actividad de reductasa, actividad de esterasa, y la integridad de membrana celular, han sido demostrada ser útil como estudios complementarios a las pruebas de viabilidad de bacterias cultivo-dependientes (Lahtinen et al., 2008). En el presente estudio la actividad celular de las bacterias en el tracto digestivo de larva de *D. labrax* fue determinado por los niveles detectables de ARNr del 16S por amplificación y visualización en TTGE. En los gels de TTGE con muestras de bacterias en *Artemia* se pudo apreciar la presencia y actividad de la cepa 8N en el tracto digestivo de *Artemia*, y una señal estimada mayor producción de ARNr 16S en tratamientos con la mas alta concentración bacteriana suministrada a los cultivos. Sin embargo este marcador de viabilidad ha presentado inconsistencias en los resultados de otros reportes (Sheridan et al., 1998).

En condiciones agnotobióticas, las bacterias *E. mexicanun* 8N y *Microbacterium* 8L son susceptibles a ser bioencapsuladas por larvas nauplio de *Artemia* a las concentraciones que regularmente se obtiene con cepas del genero *Vibrio*. Estas bacterias *Exiguobacterium mexicanum* 8N DSM 16483^T y *Microbacterium* sp. 8L DSM 16485^T pueden estar presentes dentro del tracto digestivo de *Artemia* en condición de actividad celular, factor importante para considerar una influencia bacteriana benéfica o probiótica en el organismo huésped, más allá de su aporte nutricional de su propia composición celular.

La bacteria *Microbacterium* sp., 8L no presentó ninguna influencia en la supervivencia de larvas de *D. labrax*, así como tampoco en la comunidad bacteriana del tracto digestivo y la ganancia de peso corporal en las larvas de 24 días de edad. La

ganancia aparente pero no significativo de peso larval con la bacteria *E. mexicanum* 8N en comparación con *Microbacterium* 8L y en los controles sin estas bacterias, y los resultados negativos de supervivencia sin alimento durante 4 días de exposición a patógenos; evidenciaron a la bacteria *E. mexicanum* 8N sin capacidad protectora hacia patógenos (capacidad probiótica de acuerdo a los criterios sugeridos de selección de probióticos), sin embargo, probablemente está involucrado en los procesos nutricionales de las larvas bajo condiciones de alimentación subóptima, y se torna como un oportunista en la condición sin alimento para las larvas de *D. labrax*.

4. PERSPECTIVAS GENERALES

EL estudio de las relaciones huésped-microbio utilizando como herramienta a los animales gnotobióticos, ha sido recomendado desde hace mas de tres décadas, con experiencias en animales mamíferos y aves gnotobióticos (Gordon y Pesti, 1971). Actualmente en los estudios de los modos de acción benéfica de bacterias en organismos acuicultivados, la recomendación tiene aplicación y vigencia (Thin et al., 2008) con experiencias en organismos modelo como el crustáceo branquiópodo *Artemia franciscana* (Orozco-Medina et al., 2002; Marques et al., 2006) y el pez ciprínido *Danio rerio* (Raws et al., 2004). El sistema de cultivo gnotobiótico utilizado en la presente tesis con *Artemia* como modelo experimental presenta una amplia gamma de aplicaciones en la investigación dentro del campo de la ecología microbiana de organismos acuicultivados, algunas de estas aplicaciones son: Evaluaciones de la capacidad inhibitoria de bacterias hacia patógenos con pruebas *in situ* e *in vivo*; estudios sobre las relaciones de dominancia, permanencia y actividad entre diferentes poblaciones de bacterias identificadas, en el ambiente del tracto digestivo; evaluaciones de dietas en base a alimento vivo (microalgas); pruebas de citotoxicidad sin la interferencia de comunidades bacterias desconocidas las cuales se conoce aumentan o disminuyen los grados de toxicidad en los organismos que las ingieren; bioencapsulación específica de bacterias para evaluaciones de propiedades nutricionales, probióticas o patógenas en organismos acuicultivados.

El cultivo gnotobiótico de *Artemia* realizado en esta tesis se proponen como una vía de estudio y búsqueda de especies de bacterias con potencial benéfico. Se considera

importante el estudio de bacterias autóctonas del tracto digestivo que presentan efectos benéficos en el desempeño de crecimiento y desarrollo de las larvas bajo cultivo, incluyendo a los géneros y especies que no pertenecen al grupo taxonómico de especies tradicionalmente evaluadas y que en general han sido tomadas de experiencias en organismos terrestres. Así mismo, el estudio sobre el aporte benéfico puede ser abordado fuera del concepto probiótico dominante que es la de ser una bacteria antagonista, protectora o estimuladora del sistema inmune hacia potenciales patógenos; ofreciendo de esta manera conocer otros tipos de interrelaciones entre comunidades bacterianas y sus huéspedes. En la presente tesis se muestra una probable forma de aporte benéfico de la bacteria *Microbacterium* sp. 8L, mediante el apoyo en la digestión del alimento por el aporte de enzimas extracelulares proteasas. Utilizando el sistema gnotobiótico en estudios posteriores, se pueden plantear evaluaciones de otras enzimas extracelulares como las lipasas y amilasas, y estas mismas evaluadas con diferentes sustratos (alimentos) con el fin de conocer sus capacidades digestivas. El consorcio *E. mexicanum* 8N y *Microbacterium* sp. 8L han mostrado efectos positivos en el desarrollo de *Artemia*, por lo que sería interesante evaluar también mezclas de enzimas extracelulares, ya que se pudo observar que proteasas de 8N presentaron índices bajos en pruebas de digestibilidad aparente de proteínas.

Las herramientas electroforéticas de DGGE y TTGE aplicadas en estudios de comunidades bacterianas en tracto digestivo de organismos acuicultivados, ofrecen información importante sobre la estructura de las poblaciones, su comportamiento en el tiempo (sucesiones, dominancias), y la posibilidad de identificarlas. Pero además de la determinación importante de la presencia de bacterias específicas, con el uso de RT-PCR para la amplificación de ARN, se plantea la posibilidad de determinar la actividad

bacteriana in situ, lo cual permite presumir alguna probable relación o influencia de actividad hacia el huésped ya que la sola presencia no lo permite. La recuperación de bacterias por cultivos ofrece información complementaria que presume presencia y viabilidad celular, sin embargo la viabilidad no necesariamente indica actividad pues la condiciones de cultivo son diferentes a las del medio ambiente natural (Lahtinen et al., 2008). El uso polifásico que incluye herramientas de microscopía, moleculares y de cultivo utilizadas en la presente tesis permitieron un conocimiento que pretende ser integral hacia la comprensión de los fenómenos que ocurren en la interacción bacteria-*Artemia* a nivel del tracto digestivo, y se sugiere aplicar este forma de estudios polifásicos, en estudios sobre ecología microbiana de ambientes acuícolas, comprendiendo estudios tales como relaciones nutricionales, probióticas, simbióticas, inmunoestimulantes, y patógenas.

5. LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food protein. Elsevier Appl. Sci. Publ. London.
- Aguilar-Uscanda, B., François, J. M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Lett. Appl. Microbiol. 37: 268-274.
- Aguirre-Guzmán, G., Mejía-Ruíz, H., Ascencio, F. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in disease of cultivated shrimp. Aquacult. Res. 35: 1395-1404.
- Albertson, N. H., Nystrom, T., Kjelleberg, S. 1990. Exoprotease Activity of Two Marine Bacteria during Starvation. Appl. Environ. Microbiol. 56: 218-223.
- Ampe, F., Thiéry, A. 1998. Microflora associated with the digestive tract of the fairy shrimp *Branchinella spinosa* (H. Milne Edwards, 1840) (Crustacea, Branchiopoda). FEMS Microbiol Lett. 158: 201-205.
- Balcázar, J. L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol. 114: 173-186.
- Bell, T. A., Lightner, D. V. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Allen Press, Lawrence, Kansas, 1988, pp. 2.
- Bergh, Ø., Vikanes, L., Makridis, P., Skjermo, J., Knappskog, D. 2001. Uptake and processing of a *Vibrio anguillarum* bacterin in *Artemia franciscana* measured by ELISA and immunohistochemistry. Fish Selfish Immun. 11: 15-22.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

- Breukelen, F. V., Hand, S. C. 2000. Characterization of ATP-dependent proteolysis in embryos of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. J. Comp. Physiol. B 170: 125-133.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.
- Coutteau, P., Lavens, P., Sorgeloos, P. 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. J World Aquacult Soc. 21: 1-9.
- Donachie, S. P., Saborowski, R., Peters, G., Buchholz, F. 1995. Bacterial digestive enzyme activity in the stomach and hepatopancreas of *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars, 1857). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 188: 151–165.
- Donachie, S. P., Zdanowski, M. K. 1998. Potential digestive function of bacteria in krill *Euphausia superba* stomach. Aquat Microb. Ecol. 14: 129-136.
- Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L., Toranzo, A. E. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. J. Appl. Bacteriol. 65: 97-101.
- Esakkiraj, P., Immanuel, G., Sowmya, S. M., Iyapparaj, P., Palavesam, A. 2007. Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for Aqua feed. Food Bioprocess Technol. 1 (on-line) <<http://www.springerlink.com/content/p918627k36t8w00p/>> [Consult: 15 may 2008]. ISSN 1935-5149. DOI 10.1007/s11947-007-0046-6.
- Farrelly, V., Rainey, F. A., Stackebrandt, E. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl Environ Microbiol. 61: 2798-2801.
- Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F., Holo, H. 2002. An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*. J. Bacteriol. 184(13): 3649-3656.

- Felgenhauer, B. E. 1987. Techniques for preparing crustaceans scanning electron microscopy. *J Crustacean Biol.* 7: 71-76.
- Ferreira, C., Capella, A. N., Sitnik, R., Terra, W. R. 1994. Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26: 299-313.
- García-Carreño, F. L., Haard, N. F. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*pleuroncodes planipes*) and crayfish (*pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.* 17: 97-113.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., Haard, N. F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gatesoupe, F. J., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C., Quazuguel P. 1997. Early weaning of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158: 117-127.
- Gelabert, R. 2001. *Artemia* bioencapsulation I, Effect of particle size on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *J Crustacean Biol.* 21: 435-442.
- Gelabert, R. 2003. Bioencapsulation in *Artemia*: II, Influences of the particle concentration in the enrichment process. *Aquaculture* 216: 143-153.
- Gessesse, A., Gashe, B. A. 1997. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnol. Lett.* 19(5): 479-481.
- Gildberg, A. 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B* 91: 425-435.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2802-2813.

- Gomez-Gil, B. 1998. Evaluation of potential probionts for use in penaeid shrimp larval culture. Tesis Doctoral, University of Stirling, 269 pp.
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M. A., Abreu-Grobois, A., Roque, A. 1998 Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Appl. Environ. Microbiol. 64: 2318-2322.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191: 259-270.
- Gordon, H. A., Pesti, L. 1971. The gntobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. Bacteriological Reviews 35(4): 390-429.
- Gorospe, J., Nakamura, K. 1996. Associated bacterial microflora in *Artemia*-rice bran culture. Isr. J. Aquacult./Bamidgeh 48(2): 99-107.
- Gorospe, J. N., Nakamura, K., Abe, M., Higashi, S. 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. Fisheries Sci. 62: 914-918.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., Ollevier, F. 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. Aquaculture 155: 387-399.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture 233: 1-14.
- Gunther, D. C., Catena, A. 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii. En: *The Brine Shrimp Artemia Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology* (Eds. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E.), Vol. 1, Universa Press, Wetteren, Belgium. pp. 213-221.
- Haki, G. D., Rakshit, S. K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour. Technol. 89: 17-34.
- Harris, J. M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. Microb. Ecol. 25: 195-231.

- Hansen, U., Peters, W. 1997/98. Structure and permeability of the peritrophic membranes of some small crustaceans. *Zool Anz.* 236: 103-108.
- Häse, C. C., Finkelstein, R. A. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* 57(4): 823-837.
- Hernandorena, A. 1991. Development of a new simplified nutritive medium for the axenic culture of *Artemia*. *Reprod. Nutr. Dev.* 31: 57-63.
- Hipólito-Morales, A. 2005. Efecto de las bacterias *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. En la supervivencia y desarrollo de *Artemia franciscana* y *Litopenaeus vannamei* en cultivos xénicos. Thesis. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, La Paz, B. C. S., México.
- Hipolito-Morales, A., Maeda-Martínez, A. M., Martínez-Díaz, S. F. 2008. The use of *Microbacterium* sp. and *Exiguobacterium mexicanum* to improve the survival and development of *Artemia* under xenic conditions. *Aquacult. Int.* DOI 10.1007/s10499-008-9175-9. On line first.
- Hootman, S. R., Conte, F. P. 1974. Fine structure and function of the alimentary epithelium in *Artemia salina* nauplii. *Cell. Tissue Res.* 155: 423-436.
- Huq, A., Huq, S. A., Grimes, D. J., O'Brien, M., Chu, K. H., Capuzzo, J. M., Colwell, R. R. 1986. Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 586-588.
- Irianto, A., Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis.* 25: 633-642.
- Ishihara, M., Kawanishi, A., Watanabe, H., Tomochika, K. I., Miyoshi, S. I., Shinoda, S. 2002. Purification of a serine protease of *Vibrio parahaemolyticus* and its characterization. *Microbiol. Immunol.* 46(4): 299-303.
- Kim, D. H., Brunt, J., Austin, B. 2006. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.* (OnlyEarly Articles). DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x

- Kotzamanis, Y. P., Gisbert, E., Gatesoupe, F. J., Zambonino-Infante, J., Cahu, C. 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol., A: Mol. Integr. Physiol.* 147(1): 205-214.
- Kumar, C. G., Joo, H. S., Koo, Y. M., Paik, S. R., Chang, C. S. 2004. Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic *Bacillus clausii* isolate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 351-357.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lahtinen, S. J., Ahokoski, H., Reinikainen, J. P., Gueimonde, M., Nurmi, J., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J. 2008. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* ISSN 0266-8254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02374.x
- Lau, W. W. Y., Jumars, P. A., Armbrust, E. V. 2002. Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callinassa*) *californiensis* (Decapoda: Thalassinidae). *Microb. Ecol.* 43: 455-466.
- Lee, C. Y., Cheng, M. F., Yu, M. S., Pan, M. J. 2002. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009: 31-37.
- Lemos, D., Navarrete del Toro, A., Córdova-Murueta, J. H., García-Carreño, F. 2004. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: *in vitro* determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture* 239: 307-321.
- Liu, L., Warner, A. H. 2006. Further characterization of the cathepsin L-associated protein and its gene in two species of the brine shrimp, *Artemia*. *Com. Biochem. Physiol. A* 145: 458-467.

- López-Cortés, A., Schumann, P., Pukall, R., Stackebrandt, E. 2006. *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov., isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. Syst Appl Microbiol. 29: 183-190.
- Lovett, D. L., Felder, D. L. 1990. Ontogeny of kinematics in the gut of the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae). J. Crustacean. Biol. 10: 53-68.
- Makridis, P., Vadstein, O. 1999. Food size selectivity of *Artemia franciscana* at three developmental stages. J. Plankton Res. 21: 2191-2201.
- Makridis, P., Fjellheim, A. J., Skjermo, J., Vadstein, O. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. Aquaculture 185: 207-218.
- Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2004. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically grown brine shrimp *Artemia franciscana*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 312: 115-136.
- Marques, A., Dinh, T., Ioakeimidis, C., Huys, G., Swings, J., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2005. Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. Appl Environ Microbiol. 71: 4307-4317.
- Marques, A., Ollevier, F., Verstraete, W., Sorgeloos, P., Dossier, P. 2006. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host–microbe interactions. J. Appl. Microbiol. 100: 903-918.
- Marques, A., Thanh, T. H., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2006. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. Aquaculture 258: 116-126.
- Martin, G. G., Simcox, R., Nguyen, A., Chilingaryan, A. 2006. Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: Structure, formation, and permeability. Biol. Bull. 211: 275-285.
- Miyoshi, S. I., Nitanda, Y., Fujii, K., Kawahara, K., Li, T., Maehara, Y., Ramamurthy, T., Takeda, Y., Shinoda, S. 2008. Differential gene expression and extracellular

- secretion of the collagenolytic enzymes by the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 283: 176-181.
- Muyzer, G., Wall, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Eds. Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D., and Bruijn, F. J.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. Section 3.4.4, pp. 7.
- Navarrete del Toro, M. A., García-Carreño, F., Díaz L., M., Celis-Guerrero, L., Saborowski, R. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. J. Exp. Zool. A 305: 645-654.
- Nishino, T., Nakayama, T. 2006. New microorganism belonging to *Microbacterium* genus useful for producing D-aminoacylase that is useful in producing D-amino acids e.g. D-phenylalanine enzyme purification via bacterium culture for use in D-amino acid production. Patent Assignee: UNIV TOHOKU. Patent Number: JP 2006055131 Patent Date: 20060302 WPI Accession No.: 2006-198026 (200621). Priority Application Number: JP 2004242846 Application Date: 20040823. National Application Number: JP 2004242846 Application Date: August 23, 2004.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3327-3332.
- Ochoa-Solano, J. L., Olmos-Soto, J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. Food microbiol. 23: 519-525.
- Orozco-Medina, C. 2001. Manejo bacteriano del cultivo de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906: aislamiento, caracterización y efecto en el cultivo larvario de *Artemia*, de bacterias heterótrofas aerobias asociadas a quistes comerciales de *Artemia*.

Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México. p 104.

- Orozco-Medina, C., Maeda-Martínez, A. M., López-Cortés, A. 2002. Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture* 213: 15-29.
- Orozco-Medina, C., López-Cortés, A., Maeda-Martínez, A. M. 2008. Aerobic gram-positive heterotrophic bacteria *Exiguobacterium mexicanum* and *Microbacterium* sp. in the gut lumen of *Artemia franciscana* larvae under gnotobiotic conditions. *Curr. Scien. Dic.* In press.
- Pedersen, B., Eggum, B. O. 1983. Prediction of protein digestibility- an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Tierphysiol., Tierernähr. Futtermittelkd.* 49: 277-286.
- Ping, L., Büchler, R., Mithöfer, A., Svatoš, A., Spittler, D., Dettner, K., Gmeiner, S., Piel, J., Schlott, B., Boland, W. 2007. A novel Dps-type protein from insect gut bacteria catalyses hydrolysis and synthesis of *N*-acyl amino acids. *Environ. Microbiol.*, 9: 1572-1583.
- Pitt, T. L., Malnick, H., Shah, J., Chattaway, M. A., Keys, C. J., Cooke, F. J., Shah, H. N. 2007. Characterisation of *Exiguobacterium aurantiacum* isolates from blood cultures of six patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(9): 946-948.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microb Mol Biol Rev* 62 (3):597-635.
- Rawls, J. F., Samuel B. S., Gordon, J. I. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *PNAS* 101(13): 4596-4601.
- Reeve, M. R. 1963. The filter feeding of *Artemia* III fecal pellets and their associated membranes. *J. Exp. Biol.* 40: 215-221.
- Ringo, E., Sperstad, S., Kraugerud, O. F., Krogdahl, A. 2008. Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic

salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. *Aquacult. Res.* 39: 1087-1100.

Riquelme, C., Araya, R., Escribano R. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: Implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Schrehardt, A. 1980. A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. En: *Artemia Research and Its Applications. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology* (Eds. Sorgeloos, P., Bengston, D. A., Declair, W., Jaspers, E.), Vol 1, Universa Press, Wetteren, Belgium. pp. 5-32.

Sheehan, D. C., Hrapchak, B. B. 1973. *Theory and Practice of Histology*. Second edition. Mosby Company, St. Louis, MO. pp. 143-145.

Sheridan, G. E., Masters, C. I., Shallcross, J. A. MacKey, B. M. 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1313-1318.

Sillero, M. A. G., Burillo, S. L., Domínguez, E., Olalla, A., Osuna C., Renart J., Sebastian J., Sillero A. 1980. Multiple proteolytic enzymes in *Artemia*. En: *The brine shrimp Artemia Vol. 2. Physiology, biochemistry, molecular biology* (Eds. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers).Universa press. Wetteren, Belgium. pp. 345-354

Snyder, S. D., Wolfe, A. F. 1980. A histological study of the digestive system of *Artemia* with reference to the production of its peritrophic membrane. *Proc. Pa. Acad. Sci.* 54: 123-127.

- Straub, D. V., Dixon, B. A. 1993. Bacteriological flora of the brine shrimp (*Artemia franciscana*) from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture* 118: 309-313.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*. Third edition. W. H. Freeman and Company, New York, USA. pps. 218, 245.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200: 147-159.
- Soto-Rodriguez, S. A., Simões, N., Jones, D.A., Roque, A., Gomez-Gil, B. 2003. Assessment of fluorescent-labeled bacteria for evaluation of in vivo uptake of bacteria (*Vibrio* spp.) by crustacean larvae. *J. Microbiol. Meth.* 52: 101-114.
- Tebbe, C. C., Schmalenberger, A., Peters, S., Schwieger, F. 2001. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. *In: Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. pp. 170.
- Terra, W. R. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem.* 47: 47-61.
- Than, P. P., Del Castillo, C. S., Yoshikawa, T., Sakata, T. 2004. Extracellular protease production of bacteriolytic bacteria isolated from marine environments. *Fish. Sci.* 70: 659-666.
- Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2008. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar. Biotechnol.* 10: 1-12.
- Tokuda, G., Yamaoka, I., Noda, H. 2000. Localization of symbiotic *Clostridia* in the mixed segment of the termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2199-2207.
- Ulitzur, S. 1974. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*: short generation-time marine bacteria. *Microb. Ecol.* 1: 127-135.

- Verschuere, L., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 1997. Monitoring Biolog patterns and *r/K*-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *J. Appl. Microbiol.* 83: 603-612.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2527-2533.
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000a. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1139-1146.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000b. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 655-671.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 404-427.

APÉNDICE A
PROTOCOLOS TÉCNICOS

P1. Extracción de ácidos nucleicos bacterianos a partir de larvas de *Artemia*

Lisis

1. En tubo Eppendorf de 1.5 mL con aproximadamente 300 larvas metanauplio II (ó 20-100 μg de células de cultivos), las cuales son previamente lavadas en agua destilada estéril y suspendidas en aproximadamente 10-20 μL de agua destilada estéril, se obtiene un homogeneizado de biomasa de *Artemia* utilizando un pistilo estéril.
2. Posteriormente, se le adiciona 80 μl del buffer de lisis TESC en cada muestra, y se “vortexea” 10 seg.
3. Luego se ponen 5 μl de SDS 10 % (para que quede a 0.5 % en solución de lisis), y 0.5-1 μL de proteínasa K PROMEGA V3021 (100 mg mL^{-1} , la concentración final de trabajo de reacción debe ser 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La suspensión es incubada a 50° C durante 30 min. Luego se añade 2 μL de lisozima SIGMA L7651 (100 mg mL^{-1}) para incubar a 30 °C por 30 min.

Extracción

4. Se añade 1 volumen (100 μ l) de fenol-cloroformo-isoamil alcohol 25:24:1 (usar la fase inferior translúcida del solución), invertir gentilmente el (los) tubo (s) dos veces e incubar a 65° C, 5 min.
5. Se mezcla gentilmente invirtiendo dos veces, para posteriormente centrifugar a 6000 $\times g$ (centrífuga Hermle Z 233 MK-Z), 5° C, 6 min.
6. Se toma la fase superior acuosa (sobrenadante) y se transfiere a un tubo nuevo. Al tubo con remanente del centrifugado se le vuelve a añadir 1 volumen de TESC para recuperar más ácidos nucleicos. Se vortexea unos segundos, y se centrifuga en las condiciones anteriormente descritas, para tomar nuevamente la fase superior acuosa y unirla con la fase acuosa obtenida anteriormente.
7. Se añade 1 volumen (200 μ l) de cloroformo-isoamil alcohol (24:1), para centrifugar la suspensión (en condiciones arriba descritas) y tomar la fase superior acuosa, colocándola en un tubo nuevo.

Precipitación

8. Se añade 0.6 volúmenes (120 μ l) de isopropanol, dejando reposar 30-60 min a temperatura ambiente. Se puede dejar en el refrigerador a 4 °C toda la noche para una mayor precipitación de ácidos nucleicos.
9. Luego centrifugar a 14000 $\times g$ a 5° C, 30 min. El sobre-nadante es descargado por inversión del tubo. Tener cuidado al descargar pues el botón puede desprenderse y salir con el sobre-nadante (descargar rápidamente para terminar con el tubo invertido en posición vertical)

10. La pastilla de ADN precipitada se lava con 50 μ l de etanol 70 % (a -20° C), vertiendolo en las paredes del tubo, lavar las paredes del tubo con el vortex 30 seg. Centrifugar a $17000 \times g$ a 5° C, durante 30 min, y decantar.
11. La pastilla se deja secar invirtiendo los tubos sobre papel aluminio a temperatura ambiente por \approx 10-30 min. Es mejor no sobre secar el ADN ya que se dificulta su resuspensión y puede causar desnaturalización de ADN.

Suspensión

12. Se resuspende la pastilla en 10-30 μ l de agua libre de RNAsas, y se guarda a -20° C. Al resuspender, con la misma punta de la micropipeta se resuspende el material pasando por las paredes del tubo suavemente unos segundos, y luego agitar con vortex a baja velocidad 1-2 segundos.

Opcional: para resuspender con más eficiencia poner los tubos en baño maría a 55° C 1-2 horas con agitación lenta.

Protocolo basado con modificaciones en: Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G. 1997. PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8): 3327-3332.

En caso de presentar una concentración baja de ADN se puede concentrar de la siguiente manera:

1. Se añade una solución salina con cationes monovalentes, la cual puede ser cualquiera de las siguientes opciones:

- a) Acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M (3 M solución de reserva).
 - b) Cloruro de sodio a una concentración final de 0.2 M (5 M solución de reserva). Se recomienda cuando el ADN contiene residuos de SDS.
 - c) Acetato de amonio a una concentración final de 2.5 M (7.5 M solución de reserva). Efectivo en la precipitación de proteínas y mantiene suspendido en ADN en la solución.
 - d) Cloruro de litio a una concentración final de 0.8 M (8 M solución de reserva).
2. Luego de 2 a 3 volúmenes de etanol absoluto frío (o 0.6 a 1 volumen de isopropanol). Se mezcla y se deja incubar; a temperatura ambiente 10-20 minutos, o 4 °C toda la noche cuando el precipitante es etanol, y a temperatura ambiente durante 10 min cuando es isopropanol.
 3. La solución se centrifuga a $15,000 \times g$, durante 15 minutos, a 4 °C. Para decantar suavemente, vertiendo el tubo por el lado contrario a donde se supone se encuentra adherida la pastilla de ADN.
 4. Lavar con 50-200 μ l de etanol vertiéndolo en las paredes del tubo y vortexear 20-30 segundos.
 5. Centrifugar a $17000 \times g$ a 4 °C, durante 30 min., y decantar. Colocar los tubos de Eppendorf con la tapa abierta e invertidos sobre papel secante a temperatura ambiente durante 10-30 minutos

6. Se resuspende la pastilla en 10-50 μ l de agua libre de RNAsas. Se obtiene una mayor suspensión del material de ADN mediante incubación de los tubos en baño maría a 55 °C con agitación lenta durante 1-2 horas. La concentración del material de ADN obtenido es determinada por cuantificación fotométrica, con UV a 260 nm. Y su visualización por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %.
7. La solución concentrada de ADN es conservada -20 °C.

P2. Procedimiento técnico para la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizante (DGGE) es un método electroforético para identificar cambios de bases simples en un segmento de ADN. Las técnicas de separación sobre las cuales el DGGE esta basado fueron descritas primero por Fisher and Lerman (1979). En un gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante, ADN de doble banda esta sujeto a un ambiente de desnaturalizante en incremento y se fusionará en segmentos discretos llamados “dominios de fusión”. La temperatura de fusión (T_m) de estos dominios es secuencia-específica. Cuando la T_m del dominio de fusión más bajo es alcanzado, el ADN llegara a estar parcialmente fusionado, creando moléculas ramificadas. La fusión parcial del ADN reduce su movilidad en un gel de poliacrilamida. Ya que el T_m de un dominio de fusión particular es secuencia específica, la presencia de una mutación alterará el perfil de fusión de este ADN cuando sean comparados con el tipo natural (wild-type). EL ADN conteniendo mutaciones encontrará cambios de movilidad en diferentes posiciones en el gel comparados con el

ADN del tipo natural. SI el fragmento de ADN se desnatura completamente, entonces la migración nuevamente llegará a estar en función del tamaño.

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

Componentes y accesorios del Sistema de Detección de Mutación Universal “The DCode™ System” (números de catálogo del 170-9080 al 170-9104, BIO-RAD) para el DGGE

Tanque de electroforesis. Reservorio para el buffer de corrida.

Módulo de control electroforesis/temperatura. Contiene el calentador, el agitador, y conduce la electroforesis para operar el sistema DCode. Combinado con el tanque del buffer, el módulo de control actúa para cerrar el sistema completamente.

Sistema formador de gradiente. Consta de diversos elementos que elaboran la mezcla de soluciones desnaturizantes (urea y formamida), y las vierten en un ensamble de vidrios para formar el gel con gradiente desnaturizante. Los elementos son:

Un recipiente **contenedor de soluciones** con dos cámaras cilíndricas, comunicadas entre sí por su base, el recipiente se coloca sobre una **placa agitadora** para mezclar la solución de una de las cámaras, la cual contiene la solución con mayor concentración de desnaturizante, ésta cámara tiene una salida de manguera de 0.4 cm de luz de

diámetro, que conduce a una **bomba peristáltica** (Bio-Rad modelo EP-1). La bomba vierte la mezcla de soluciones en un ensamble de vidrios o sándwich.

Sándwich o ensamble. Esta formado por un par de pinzas que presionan en sus extremos laterales a un par de vidrios (Vidrio 1: 18.3 x 20 x 0.3 cm, Vidrio 2: 16 x 20 x 0.3 cm). A la superficie interna del vidrio 2, que tendrá contacto con el gel, se le aplica solución repelente con ayuda de una toalla absorbente, dejar secar por 5 min. Los extremos de los vidrios sostenidos por las pinzas, se encuentran separados por separadores de plástico (1.9 x 18.3 cm., 0.1 cm de grueso). Los vidrios y los separadores son alineados con una hoja de alineación (0.05 cm de grueso), mientras el ensamble es colocado en una base de montaje (Figura 1). Las pinzas y la base de montaje ejercen presión en las placas de vidrio con los separadores para impermeabilizar el ensamble al verter las soluciones desnaturalizantes. En el extremo superior del ensamble se coloca un peine cuando se esté vertiendo el volumen final de las soluciones formadoras del gel. El peine consta con 10 dientes (1.7 cm de largo, 1.1 cm de ancho, y 0.1 cm de grueso) que darán a lugar los pozos del gel.

Aplicación de solución repelente. En el vidrio mas corto que conforma el ensamble para el gel, es impregnado con solución repelente en la superficie de contacto con el gel antes de ser ensamblado para su fácil retiro una vez terminada la electroforesis. La solución repelente se aplica dentro de la campana de extracción con equipo de seguridad (guantes, lentes, y cubre bocas), en una cantidad de 500-1000 μ L de solución Repel-Silane ES (Plusone No. 17-1332-01, Pharmacia Biotech) sobre la superficie deseada. Con papel absorbente se distribuye en la superficie del vidrio y se deja secar 5-10 min. Posteriormente se lava levemente con alcohol al 70 % por aspersión, y se elimina con papel secante (el material utilizado se confina en recipiente de desechos tóxicos).

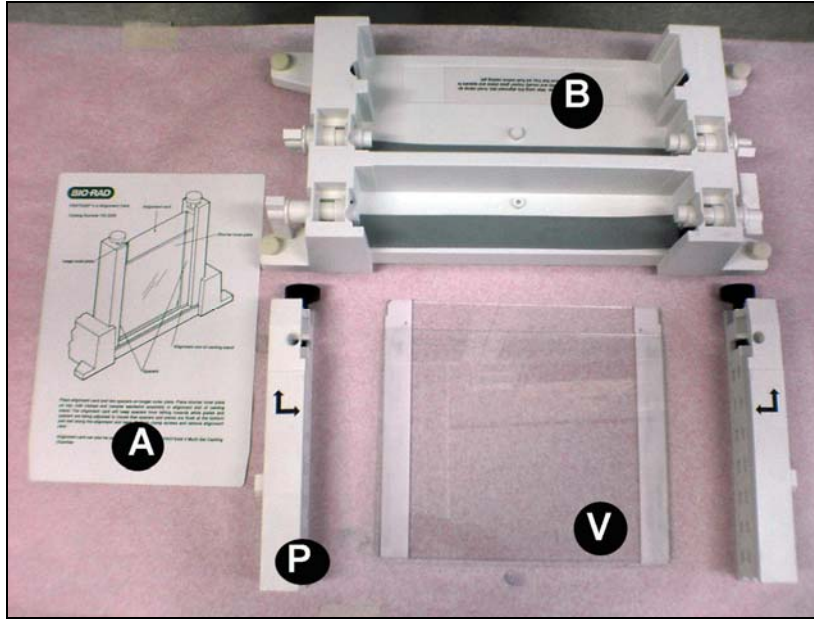


Figura 1. Elementos del sistema D-Code de Bio-Rad para formar el ensamble de vidrios. Base de montaje (B), pinzas (P), vidrios (V), separadores, hoja de alineación (A).

Aplicación de grasa siliconada. Los separadores de los vidrios y las superficies de contacto de los vidrios en aquellos, son cubiertos con una película fina de grasa siliconada (High vacuum grease, Dow Corning Corp.), así como en la superficie de la esponja presente en la base de montaje que entre en contacto con el ensamble de vidrios. La grasa siliconada impermeabiliza el ensamble durante la formación del gel, y corrige los efectos de distorsión de las bandas de DNA en el gel durante la electroforesis.

Base de montaje. Sostiene el ensamble de vidrios de manera vertical para alinear los vidrios (se apoya de una hoja o tarjeta de alineación), y para verter las soluciones formadoras del gel.

Corazón. El corazón la estructura que sostiene el sándwich o ensamble de vidrios con el gel; sostiene un ensamble de vidrio en cada lado. Es colocado dentro del tanque de electroforesis y porta en sus extremos verticales los polos conductores de energía para la electroforesis.

Preparación de soluciones desnaturalizantes

La formación del gel con gradiente desnaturalizante para la electroforesis se lleva a cabo con la mezcla de dos soluciones, una con alta concentración de desnaturalizante, en éste caso 90 % (Tabla 1). Para preparar la solución con alto porcentaje de desnaturalizante es necesario disolver la urea mediante un calentamiento y agitación manual durante algunos minutos.

Tabla 1. Ingredientes para la preparación de las soluciones de reserva con alta concentración de desnaturalizante (90 % ó 70 %), y con nula presencia de desnaturalizante (0 %). Soluciones utilizadas en la elaboración del gel de DGGE.

Reactivo	90 %	70 %	0 %
Urea (SIGMA U-4128)	37.8 g	29.4 g	---
Formamida desionizada (BIO-RAD Control 8438)	36 mL	28 mL	---
Archilamida/bis 40 % (40 % acrylamide/bis 37.5:1 Cat. 161-0148)	15 mL	15 mL	15 mL
TAE 50X	2 mL	2 mL	2 mL
Aforar con agua destilada a:	100 mL	100 mL	100 mL

Las soluciones se aforan con agua destilada en matraz aforado de 100 mL. Se conservan refrigeradas, en frasco ámbar, por un mes con calidad suficiente.

Preparación del gel desnaturalizante para el DGGE

A partir de las soluciones de reserva de 0 y 90 % (puede ser 100 % también), se preparan las soluciones que formaran el gel de DGGE. Para prepara un gel de DGGE con 6 % de acrilamida/bis, y gradiente de 30 a 70 % de desnaturalizante se preparan tres soluciones. Un par de soluciones comprenden determinado rango de concentración de desnaturalizante, en este caso va de 30 a 70 %, y una tercera solución que no contiene desnaturalizante (0 %). Esta solución final se vierte en la parte superior del gel, denominado “gel de carga”, en ésta zona se forman los pozos para cargar las muestras de ADN (que son productos de PCR presentando secuencias con dominios de baja fusión denominados “colas”). En las soluciones con 100 % de desnaturalizante, la urea tenderá a retirarse de la solución estando a 4° C. Asegurarse de calentar la solución de reserva (100 %) para disolver la urea antes de mezclar el desnaturalizante deseado.

Tabla 2. Ingredientes para la preparación de las soluciones con concentración de desnaturalizante que formarán el gradiente en el gel de 30 a 70 % a partir de soluciones de reserva de **0 y 90 %** de desnaturalizante; y la solución con **0 %** de desnaturalizante, para la zona de carga. Soluciones que formarán el gel de DGGE en el ensamble de vidrios.

Solución original	30 % final	70 % final	0 % final
Sol Desnat. 90 %	3.75 mL	8.6 mL	0 mL
Sol. Desnat. 0 %	7.4 mL	2.47 mL	5 mL
TEMED ²	6.9 µL	6.9 µL	5 µL
APS 10 % ³	52.3 µL	52.3 µL	37.5 µL
Vol. Total:	≈ 11.1 mL	≈ 11.1 mL	≈ 5 mL

Las soluciones que formarán el gel de DGGE se preparan en un matraz “quitazato” de 50 mL, para luego añadir la solución TEMED. Los matraces se agitan manualmente al mismo tiempo que se encuentran conectadas a una bomba de vacío a 15 pulg.Hg durante 1-3 min para la desgasificación. El matraz es tapado con papel aluminio.

Tabla 3. Ingredientes para la preparación de las soluciones con concentración de desnaturalizante que formarán el gradiente en el gel de 30 a 70 % a partir de soluciones de reserva de **0 y 70 %** de desnaturalizante; y la solución con 0 % de desnaturalizante, para la zona de carga. Soluciones que formarán el gel de DGGE en el ensamble de vidrios.

reactivo	30 % final	70 % final	0 % ¹ final
Sol Desnat. 70 %	4.9 mL	11.1 mL	0.0 mL
Sol. Desnat. 0 %	6.2 mL	0.0 mL	8.0 mL
TEMED ²	6.9 µL	6.9 µL	8.0 µL
APS 10 % ³	52.3 µL	52.3 µL	60.0 µL
Vol. Total:	≈ 11.1 mL	≈ 11.1 mL	≈ 8.0 mL

¹ Se utiliza 8 mL de volumen total en lugar de 5 mL como en la tabla 1, para un llenado total con exceso en la cámara del ensamble de vidrios, considerando que la solución reduce su volumen al solidificarse.

² TEMED, N,N,N’N-Tetra-metiletenodiamina, BIORAD Cat. 161-0801.

³ APS, Amonio persulfato, BIORAD Cat. 161-0700. Se diluye en agua destilada mili Q.

Una vez desgasificadas las soluciones, son vertidas en el sistema formador de gradiente (Bio-Rad modelo 385). La solución con alto porcentaje del des-naturalizante (solución con 70 %) es mezclada con 100 μ L de “Dye Solution DCode” control 300001792, el cual permite visualizar la formación del gradiente en el gel, relacionándolo proporcionalmente con la intensidad del color; posteriormente, la solución es vaciada en la columna del sistema que se localiza próxima a la manguera de salida, la cual contiene un magneto con agitación; la solución con bajo porcentaje de desnaturalizante es vertido en la columna distal al efluente (Figura 2). La solución de APS 10 % es añadida y mezclado en ambas soluciones desnaturalizantes momentos antes de iniciar la formación del gradiente en el ensamble de vidrios, colocado en la base de montaje.

Es importante revisar que el ensamble de vidrios sea impermeable a las soluciones vertiendo agua destilada mili Q y esperar 5 minutos, luego desaguar y secar con papel Whatman # 1. También el sistema formador de gradiente se evalúa vertiéndole agua destilada mili Q para asegurar que haya una eficiente comunicación entre columnas, y que los conductos de la manguera y jeringa se encuentren limpias y abiertos.

Formación del gel de DGGE

Una vez listas las soluciones en el sistema formador de gradiente se enciende la bomba peristáltica a una velocidad de 3.5 mL por minuto. El tiempo de vaciado de la mezcla es de 6-7 min (se debe verter en \approx 5 min para evitar el rompimiento del gradiente). Asegurar que la aguja de la jeringa esté colocada dentro del sándwich de vidrios antes de iniciar el vaciado. Al terminar de vaciar las soluciones completamente, se deja polimerizar por 30 min al menos, para posteriormente verter la solución de 0 % de desnaturalizante (el cual es puesto en una de las cámaras con agitación y 37.5 ó 60 μ L

de APS (según el caso de tabla 1 ó 2), ésta solución será el “gel de carga”, en esta etapa se coloca el peine en los vidrios, se recomienda dejar desbordar un poco de la solución en los vidrios, pues el volumen de la solución se reduce al polimerizar. Se deja solidificar durante al menos 60 min. Previo al montaje del gel dentro de la cámara de DGGE, se quita el peine y los pozos son lavados con agua destilada miliQ usando una piseta, del mismo modo en el extremo opuesto del gel.

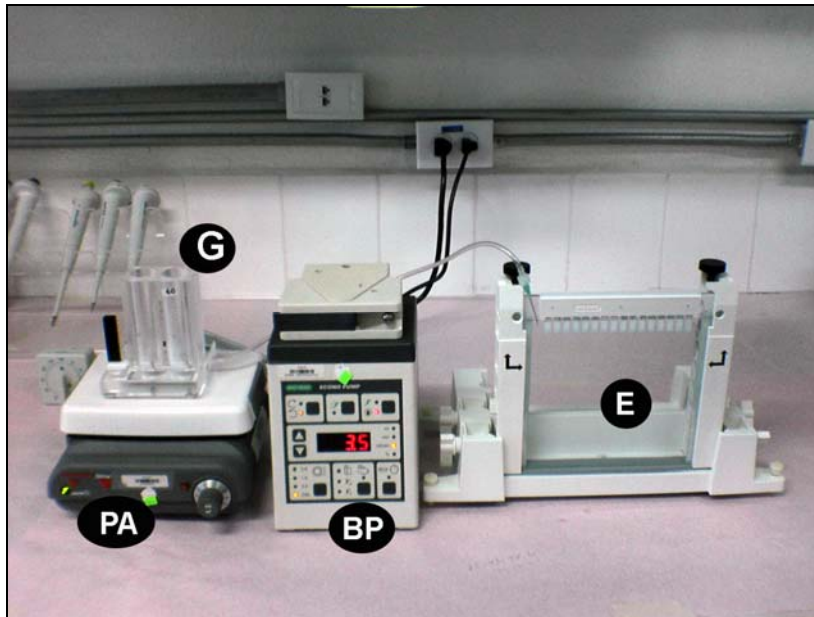


Figura 2. Formación del gel de DGGE en proceso. Sistema formador de gradiente (G) sobre placa de agitación (PA), bomba peristáltica (BP) y sándwich o ensamble de vidrios (E). (Foto de César Orozco Medina).

Electroforesis del gel de DGGE

La cámara de DGGE (DCODE™ Bio-Rad) debe contener 7 L de buffer TAE 1X. El sándwich conteniendo el gel de DGGE, es montado en el Corazón o portador del sándwich, e introducido en el tanque de electroforesis. Una vez formado el gel se retira el peine con cuidado. IMPORTANTE: Lavar los pozos con buffer TAE1X para eliminar los residuos de poliacrilamina no polimerizada. Aquellos pozos que no sean llenados con productos de PCR deben ser llenados con buffer.

Se coloca el módulo de control para cerrar el sistema de DGGE y activarlo. Primero se enciende la bomba, la cual hace circular el buffer, luego se enciende el calentador y se programa para que el buffer alcance 65° C de temperatura, lo cual se obtiene en 2 horas.

Una vez alcanzada la temperatura programada, se apaga el equipo y se desmonta el módulo de control para cargar las muestras en los pozos del gel.

Volúmenes (10 a 40 μL) de productos de PCR con concentraciones entre 500 a 1500 ng μL^{-1} de DNA total son mezclados con 10 μL de buffer de carga para DGGE, dependiendo del número de bandas que se esperan obtener en cada carril (muestra) del gel. Determinar previamente la distribución de las muestra en el gel. Al terminar de cargar, se programa la temperatura a 60° C, se enciende el calentador, sin la bomba de circulación, y se inicia la electroforesis a 50 Volts hasta observar que el buffer de carga ha ingresado al gel (aproximadamente 10 min), posteriormente se enciende la bomba de recirculación del D-Code, esto es con el fin de evitar un lavado de las muestras por el movimiento del buffer, (Figura 3).

El inicio de la corrida de electroforesis se recomienda sea por la tarde para que trabaje durante la noche. Con 12-16 h de electroforesis es suficiente para que las bandas se encuentren separadas en muestras con material de bacterias de los géneros *Vibrio*,

Exiguobacterium, y *Microbacterium* obtenidos de ambientes de cultivos gnotobióticos de *Artemia*.

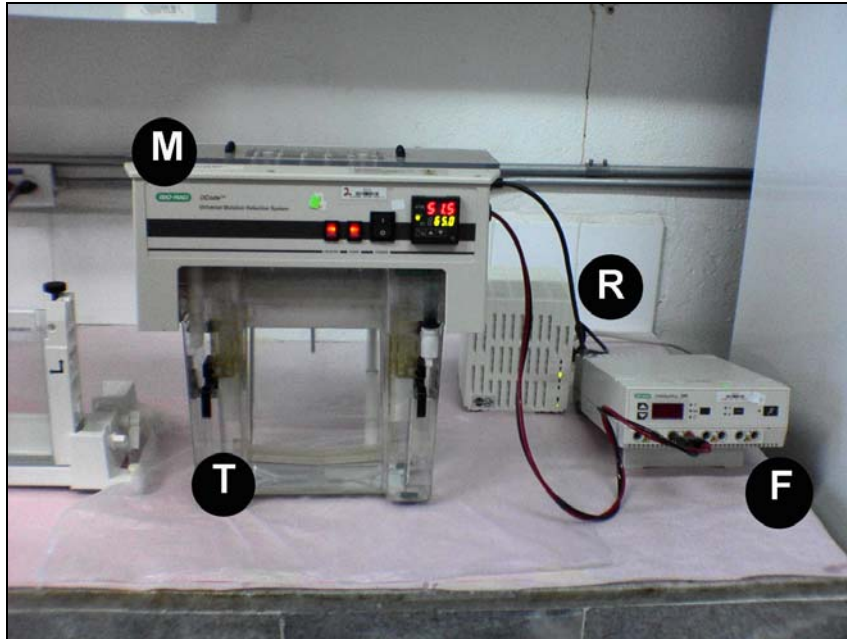


Figura 3. Sistema D-Code de DGGE en funcionamiento, mostrando el módulo de control (M) montado sobre el tanque de electroforesis (T). La energía de electroforesis es suministrada a través de la fuente de poder BioRad Power Pac 300 (F), la cual a su vez esta conectada a un regulador de voltaje (R). (Foto de César Orozco Medina).

Tinción del gel de DGGE con nitrato de plata

Fijación

El ensamble de vidrios que contiene el gel de DGGE, es desarmado para remover el vidrio menor. El gel (adherido o suelto sobre el vidrio mayor) es colocado dentro de una

charola con tapa conteniendo una **solución de fijación**, la cual contiene 500 mL de solución de ácido acético glacial al 10 % en agua bi-destilada (mili Q), se expone durante 30 m con agitación lenta (20 rpm). Posteriormente el gel es enjuagado en agua bi-destilada durante 5 m con agitación lenta, dos veces. La solución de fijación se recupera para su uso posterior en la detención química del proceso de revelado.

Tinción

El gel colocado dentro de la charola, protegido de la incidencia de luz, es expuesto a 560 mL de **solución de tinción** de nitrato de plata (preparada momentos antes de su uso), durante 30 m con agitación lenta. Al terminar, la solución de tinción es removida y el gel es lavado con agua bi-destilada por 20 s.

Revelado

Una vez teñido el gel se cambia de charola y la solución de tinción remanente es eliminada por enjuague con una pequeña cantidad de solución de revelado durante 20 s. El revelado del gel se realiza en charola con 600 mL de **solución de revelado**, al principio se agita rápido para evitar que el exceso de plata precipite sobre el gel, luego, el gel es agitado suavemente durante algunos minutos hasta visualizar las bandas de ADN. El momento en que el patrón de bandas es visible, la reacción de revelado es detenida transfiriendo inmediatamente el gel a la solución de ácido acético que fue utilizada para la fijación; la charola con el gel se agita lentamente durante 5 minutos al menos. Luego se descarga la solución de ácido acético para enjuagar el gel con agua bi-destilada, para eliminar los restos de la tinción de nitrato de plata.

El gel teñido y revelado es foto-documentado en imagen digital en formato TIFF a través de un equipo rastreador óptico de imagen “scanner”.

En caso de que el gel haya quedado muy oscuro, se puede dar un baño de agua destilada con un poco de ácido acético para aclarar el color del gel.

Preparación de soluciones para la tinción de geles de DGGE con nitrato de plata

Solución de fijación

Disolver 50 mL de ácido acético glacial en 450 mL de agua destilada mili Q. Conservar en refrigeración antes de usar. Debe estar a 8° C de temperatura.

Solución de tinción

En 560 mL de agua destilada mili Q se disuelven 0.5 g de nitrato de plata [AgNO₃] (SIGMA S-7276), y 750 µl de formaldehído [CH₂O] al 37 % (SIGMA F-1635). Se recomienda preparar la solución momento antes de utilizarla. Cubrir la solución lo más posible de la incidencia de la luz durante la preparación y su aplicación.

Para un litro se mezclan:

1g de nitrato de plata

1.5 mL de formaldehído al 37 % (p/v)

1000 mL de agua bi-destilada.

Solución de revelado

En 600 mL de agua destilada mili Q se disuelven 13.99 g de carbonato de sodio anhidro $[\text{Na}_2\text{CO}_3]$ (SIGMA S-2127), la solución en ésta etapa es enfriada a 10°C antes continuar con su preparación y uso inmediato. Posteriormente, se disuelven 1.2 mL de formaldehído 37 %, y 0.6 mL de tiosulfato de sodio $[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ (SIGMA S-8503) al 0.2 % (0.03139 g de tiosulfato de sodio en 10 mL de agua destilada).

Para un litro se mezclan:

56.3 g bicarbonato de sodio (deca-hidratado)

2 mL formaldehído (37 % p/v)

1 mL tiosulfato de sodio al 0.2 %

1000 mL agua destilada. Almacenada a 8°C .

Observaciones.

- Se recomienda suspender inmediatamente la revelación una vez apreciadas las bandas, pues la prolongación del tiempo de revelado no mejora considerablemente la intensidad de las bandas pero si aumenta el oscurecimiento del gel.
- Lavar las placas de vidrio con agua caliente y jabón detergente, luego enjuagar con agua de la llave, enjuagar con etanol 95 %, y finalmente enjuagar con agua destilada y secar con papel absorbente.
- Renovar la solución buffer TAE 1X del tanque luego de 2 corridas de electroforesis.

Referencia: Tebbe, C.C., Schmalenberger, A., Peters, S., Schwieger, F. 2001. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In: Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. pp. 161-175.

Tinción del gel de DGGE con bromuro de etidio

Tinción

El gel de DGGE es despegado del ensamble de vidrio y enjuagado en agua destilada 30 s, para posteriormente embeber en la solución de tinción bromuro de etidio (25 μ l de bromuro de etidio al 1 % [10 mg mL⁻¹], disueltos en 500 mL de buffer TAE 1X), con concentración final de 0.5 μ g mL⁻¹. Incubación en la oscuridad durante 30 min.

Visualización

El gel teñido con bromuro de etidio es enjuagado en agua destilada 10 min. La visualización de las bandas de ADN en el gel es mediante la exposición del gel a luz ultravioleta a través de un trans-iluminador. La imagen es foto-documentada en formato TIFF para su análisis posterior.

APÉNDICE B.
PRIMER ARTÍCULO

Date: 10 Oct 2008 11:23:01 -0000
From: "JegajothivelPandian Thavamani" <tjpandian@rediffmail.com>
Reply-To: "JegajothivelPandian Thavamani" <tjpandian@rediffmail.com>
To: "Alejandro Maeda" <almaeda04@cibnor.mx>

TO WHOM IT MAY CONCERN

In my capacity as a member of Editorial Board of Current Science and as Guest Editor of the special section on "Large branchiopods", I am pleased to inform that ms titled "**Aerobic gram-positive heterotrophic bacteria *Exiguobacterium mexicanum* and *Microbacterium sp. in the gut lumen of Artemia franciscana* larvae under gnotobiotic conditions**" jointly authored by **César Orozco-Medina** is accepted for publication in Current Science and the paper will appear possibly this December 25th issue.

with regards,
Prof.T.J. Pandian

Date: Tue, 9 Sep 2008 12:15:12 +0530 (IST)
From: Current Science <currsci@ias.ernet.in>
To: almaeda04@cibnor.mx
cc: tjpandian@rediffmail.com

Dear author,

Your paper, submitted to Prof T.J. Pandian, for the special section "Large Branchiopods", is accepted for publication.

Regards,

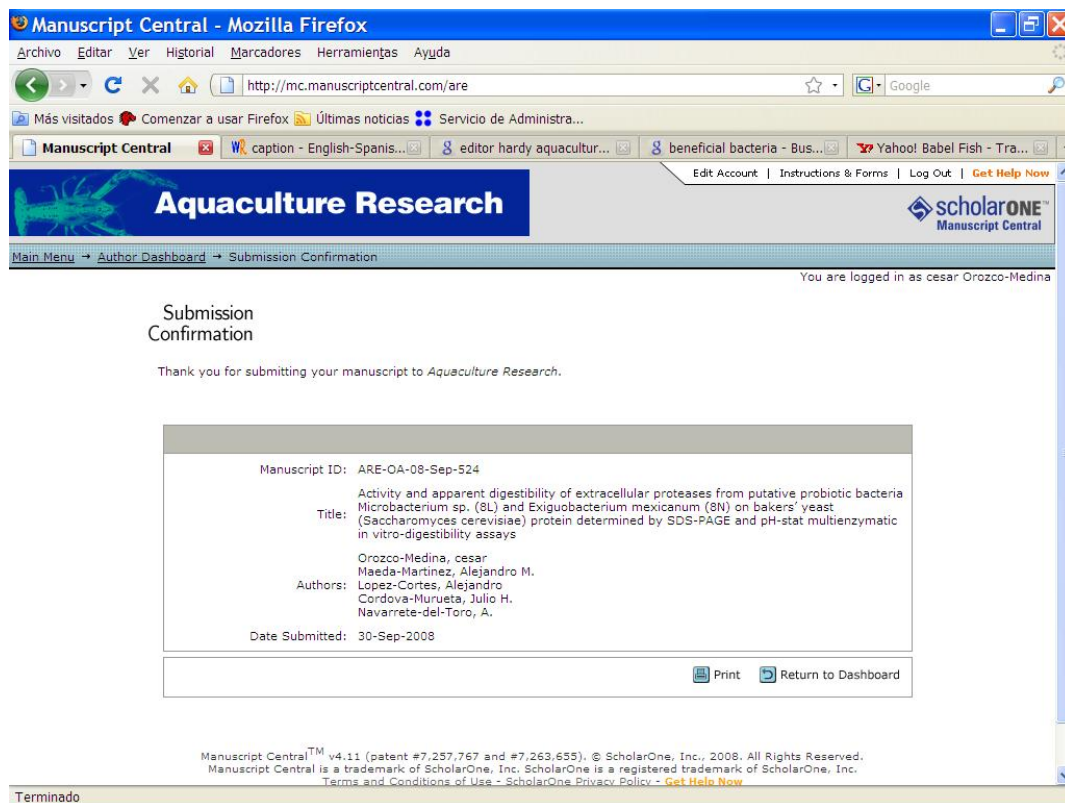
Chandrika Ramesh

for Editor

Current Science

APÉNDICE C.

SEGUNDO ARTÍCULO



Manuscript Central - Mozilla Firefox

Archivo Editar Ver Historial Marcadores Herramientas Ayuda

http://mc.manuscriptcentral.com/are

Más visitados Comenzar a usar Firefox Últimas noticias Servicio de Administra...

Manuscript Central W caption - English-Spanis... editor hardy acuacultur... beneficial bacteria - Bus... Yahoo! Babel Fish - Tra...

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | [Get Help Now](#)

Aquaculture Research scholarONE[™] Manuscript Central

Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation You are logged in as cesar Orozco-Medina

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Aquaculture Research*.

Manuscript ID:	ARE-OA-08-Sep-524
Title:	Activity and apparent digestibility of extracellular proteases from putative probiotic bacteria <i>Microbacterium</i> sp. (8L) and <i>Exiguobacterium mexicanum</i> (8N) on bakers' yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) protein determined by SDS-PAGE and pH-stat multienzymatic in vitro-digestibility assays
Authors:	Orozco-Medina, cesar Maeda-Martinez, Alejandro M. Lopez-Cortes, Alejandro Cordova-Muruetta, Julio H. Navarrete-del-Toro, A.
Date Submitted:	30-Sep-2008

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

Manuscript Central[™] v4.11 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Terminado

Activity and apparent digestibility of extracellular proteases from putative probiotic bacteria *Microbacterium* sp. (8L) and *Exiguobacterium mexicanum* (8N) on bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein determined by SDS-PAGE and pH-stat multienzymatic in vitro-digestibility assays