CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA MARINA

# *Caracterización de la Comunidad Bacteriana Presente en Cultivo de Camarón Litopenaeus vannamei, Utilizando Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) y PCR.*

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios
para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

**Maribel Padilla Sánchez**

Ensenada, Baja California A 6 de Septiembre del 2005

TESIS DEFENDIDA POR

Maribel Padilla Sánchez

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Jorge Olmos Soto
Director del Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Miembro del Comité

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Miembro del Comité

Dr. Facundo Márquez Rocha
Coordinador de Posgrado en
Acuicultura y Biotecnología Marina

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

6 de Septiembre del 2005

**RESUMEN** de la tesis de Maribel Padilla Sánchez, que presenta como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con orientación en **BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Septiembre del 2005.

**Caracterización de la Comunidad Bacteriana Presente en Cultivo de Camarón *Litopenaeus vannamei*, Utilizando Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) y PCR**

Resumen aprobado por:

_____

Dr. Jorge Olmos Soto

La camaronicultura mundial enfrenta actualmente problemas patológicos debido a la presencia de bacterias, ocasionando grandes pérdidas económicas. Por lo que, se hace necesario aumentar el conocimiento de la diversidad bacteriana presente en el camarón durante el desarrollo de un cultivo. Esta información llevaría a un mejor entendimiento de lo que sucede en el cultivo, además de poder identificar y prevenir algunas enfermedades.

Para explorar la microbiota presente en el camarón cultivado, en este trabajo se analizaron los tejidos de: hepatopáncreas, intestino y branquia en el camarón *Litopenaeus vannamei* con las herramientas moleculares Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizaron a las moléculas 16S rRNA/rDNA como marcadores moleculares. Cinco grupos bacterianos metabólicamente activos se identificaron por FISH: las Gram (+) bajas en G+C y altas en G+C, *Proteobacteria, ά*, *δ* y $\gamma$. Los grupos Gram (+) altas en G+C y *Proteobacterias γ* fueron dominantes en los tres tejidos analizados, siendo el intestino donde se observó mayor número y grupos de bacterias. Por PCR se identificaron además de los cinco grupos identificados por FISH, el grupo de las *Proteobacterias β*, las Pseudomonas γ al genero *Bacillus*.

**Palabras clave**: FISH, PCR, Diversidad bacteriana

**ABSTRACT** of the thesis presented by Maribel Padilla Sánchez, as a partial requeriment to obtain the **MASTER IN SCIENCE** degree with orientation in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. Septiembre 2005.

**Caracterization of the Bacterial Community Associated en Shrimp culture of *Litopenaeus vannamei*, utility Fluorescente In Situ Hybridization (FISH) and PCR**

Abstract approved by:

_____

Ph.D. Jorge Olmos Soto

World wide shrimp production have pathological problems due bacterial diseases, which represents big economical loses. In this sense, it is of great importance to know the bacterial diversity present on the shrimp between culture developments. Having this information, we will be able to understand and to improve the behavior of the shrimp culture. In addition, with this information there will be possible to identify and to prevent bacterial diseases.

To know the bacterial diversity present on the shrimp culture, in this work we analyzed several shrimp farm from San Felipe B.C. Mexico. The bacterial diversity present on the shrimp tissues was analyzed by Fluorescente In Situ Hybridization (FISH) and by the Polimerase Chain Reaction (PCR), molecular methodologies.

16S rRNA/rDNA were used as molecular markers to identify the bacterial groups. Five metabolically active groups (Gram (+) bajas en G+C y altas en G+C, *Proteobacterias* $\gamma$, $\acute{\alpha}$ y $\delta$) were identified by FISH. Furthermore, β-*Proteobacterias,* Pseudomonas and species of the genus *Bacillus* were identified by PCR, in addition to the five bacterial groups identified by FISH.

**Keywords**: FISH, PCR, bacterial diversity.

# AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por haber apoyado esta investigación a través del proyecto 340335-B.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación superior de Ensenada, por su apoyo económico y material.

Al Dr. Jorge Olmos Soto que con su asesoría y consejos, me ayudo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jesús Paniagua Michel por su valiosa asesoría en el desarrollo de este trabajo.

Al Comité de Tesis por el aporte de sus conocimientos, disposición e invaluable comentarios, para el enriquecimiento de esta tesis.

A la M en C. Rosalía Contreras por su apoyo técnico dentro del laboratorio.

# DEDICATORIA

A mi gran amor **Cristopher** por lo momentos robados…..

Especialmente a mí esposo **Juan Francisco** por su amor, su paciencia, compresión y por compartir los momentos de alegría y tristeza.....

Profundamente a mis padres **Jesús José Padilla** y **Leonor Alicia Sánchez** por su gran amor incondicional, sus enseñanzas, y ese gran apoyo brindado a través del tiempo y la distancia…..

# CONTENIDO


Página

INTRODUCCION……. 1

ANTECENTES…….. 5

I. Enfermedades bacterianas en organismos marinos cultivables…….. 5

II. Comunidades bacterianas…….. 7

III. 16S rRNA/rDNA como marcador molecular……... 8

IV. Pruebas moleculares FISH y PCR……... 10

JUSTIFICACION…….. 16

OBJETIVO GENERAL……. 17

OBJETIVOS PARTICULARES…… 17

MATERIALES Y METODOS…….. 18

I. Recolección y preparación de muestras…….. 19

II. Identificación de la diversidad bacteriana por FISH……. 20

II. 1. Cultivos bacterianos…….. 20

II. 2. Preparacion de muestras…… 21

II. 3. Hibridación con la sonda fluorescente…….. 22

II. 4. Tinción con DAPI…… 23

II. 5. Observación al microscopio de epifluorescencia……. 23

III. Análisis cuantitativo……. 24

IV. Identificación de la diversidad bacteriana por PCR…… 25

IV.1. Amplificación por PCR…… 25

V. Aislamiento y cultivo de cianobacterias…… 27

V.1. Caracterización morfológica…….. 29

V.2. Caracterización molecular……..... 29

V.2. 1. Extracción de DNA cromosomal……... 29

V.2. 2. Amplificación por PCR de los ITS…… 30

CONTENIDO (continuación)

Página

V.2. 3. Patrones de restricción de cianobacterias (RFLP). 31
V.2. 4. Secuenciación……. 32
RESULTADOS Y DISCUSION..…… 33
I. Análisis de la diversidad bacteriana por FISH……..... 33
I. 1. FISH de cultivos bacterianos…….. 34
I. 2. FISH en muestras de tejido de camarón……. 36
II. Análisis por PCR……... 52
III. Aislamiento y purificación de cianobacterias…….. 56
III. 1. Identificación morfológica……..… 57
III. 2. Identificación molecular…….. 57
CONCLUSIONES……. 61
PERSPECTIVAS……... 63
REFERENCIAS…… 65
ANEXOS…… 72

LISTA DE FIGURAS


| No. Figura | | Página |
|---|---|---|
| 1 | Diagrama de flujo de la estrategia experimental para la identificación de la diversidad bacteriana. | 18 |
| 2 | Diagrama esquemático para la observación microscópica de muestras. | 24 |
| 3 | Análisis por FISH de cultivos bacterianos. En donde se observan, los controles positivos y negativos de los grupos bajas en G+C y gamas. | 35 |
| 4 | Análisis por FISH de las muestras de hepatopáncreas, en tres muestreos realizados, durante el desarrollo del cultivo de camarón. | 39 |
| 5 | Análisis por FISH de las muestras de branquia, en tres muestreos realizados, durante el desarrollo del cultivo de camarón. | 44 |
| 6 | Análisis por FISH de las muestras de Intestino, en tres muestreos realizados, durante el desarrollo del cultivo de camarón. | 48 |
| 7 | Observación microscópica de cianobacterias encontradas en hepatopáncreas de camarón. | 50 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)


| No. Figura | | Página |
|---|---|---|
| 8 | Análisis bacteriano por FISH, en donde se muestran diferentes tipos de morfologías y distribución bacteriana | 51 |
| 9 | Análisis bacteriano por FISH, que muestra la diversidad bacteriana en hepatopáncreas, branquia e intestino | 51 |
| 10 | Análisis electroforético de la amplificación del I6S rDNA con 7 oligonucleótidos de grupo. | 53 |
| 11 | Observación microscópica de cianobacterias filamentosas aisladas de hepatopáncreas de camarón | 56 |
| 12 | Análisis electroforético de la región intergénica 16S-23S de cianobacterias. | 58 |
| 13 | Análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S de cianobacterias. | 60 |

LISTA DE TABLAS


| No. Tabla | | Página |
|---|---|---|
| I | Etapas de crecimiento en camarón y temperatura de los estanques, en los 3 muestreos realizados. | 19 |
| II | Oligonucleótidos utilizados para la identificación bacteriana por FISH. | 21 |
| III | Oligonucleótidos utilizados para la identificación bacteriana por PCR. | 26 |
| IV | Programa de tiempos y temperaturas de amplificación por PCR. | 27 |
| V | Programa de tiempos y temperaturas de amplificación por PCR | 31 |

# INTRODUCCIÓN

El camarón es un recurso marino de gran importancia como fuente generadora de alimentos y de empleo. *Litopenaeus vannamei* es una de las especies más cultivada en México y a nivel mundial ya que posee características importantes como su capacidad de crecer en altas densidades y su resistencia a las fluctuaciones ambientales (Lee, 1992).

La demanda elevada de este organismo ha propiciado el desarrollo de la acuacultura, la cual en los últimos años ha tenido serios problemas a causa de enfermedades generadas por la alta densidad poblacional, la calidad de agua y temperaturas extremas, lo que afecta el rendimiento del cultivo.

En los últimos años los problemas patológicos más reportados son los causados por virus y bacterias. La *vibriosis,* ocasionada por diferentes especies del género V*ibrio*, es de las enfermedades bacterianas comúnmente reportadas. Otros géneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas, Citofagas* y *Flavobacteria*, se han encontrado asociados a patologías y mortalidades en crustáceos, peces y moluscos bivalvos. Por mucho tiempo las bacterias han sido identificadas por métodos tradicionales, en la actualidad los métodos moleculares han revelado que una gran cantidad de agentes etiológicos no han sido identificados, debido a que no pueden ser recuperados en el laboratorio.

Tomando en cuenta que la flora bacteriana natural en un medio esta compuesta por bacterias patógenas y no patógenas, se puede considerar que una

alteración en el medio como la temperatura, salinidad, alimentación, además del estado fisiológico del camarón, propicia el desarrollo de patógenos oportunistas y en consecuencia el desarrollo de la enfermedad.

Por lo que, el conocimiento de la diversidad bacteriana durante el desarrollo de un cultivo, es importante para prevenir las enfermedades o comprenderlas cuando se presente, teniendo así un antecedente acerca de las alteraciones que se presentan en ciertos grupos bacterianos cuando las condiciones de cultivo han sido alteradas a través del tiempo, permitiendo determinar cuáles grupos bacterianos proliferan o disminuyen cuando existe un cambio en el medio y así determinar que especies bacterianas fueron responsables de la mortalidad de los organismos en cultivo.

Anteriormente, se han utilizado técnicas clásicas para identificar bacterias en muestras del medio ambiente. Theron y Cloete (2000), reportaron técnicas dependientes de cultivo, combinadas con diferenciación, utilizando pruebas fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, estos métodos no reflejan la totalidad de la comunidad bacteriana debido a que sólo el 1 % de las bacterias pueden ser cultivadas en el laboratorio (Amann 1990 y Frischer *et al.,* 1996) y en el caso de las bacterias marinas esta estimado que puede ser menos del 0.1 % (Kogure *et al*., 1980). Además las técnicas de bacteriología tradicional requieren de tiempos prolongados para su realización y son de poca confiabilidad, debido a que la morfología de las bacterias es demasiado simple para ser empleada como una base sólida de clasificación (Amman *et al*., 1995).

Actualmente se conoce que la totalidad de una comunidad bacteriana esta compuesta por organismos cultivables y no cultivables. Con los métodos moleculares el estado actual de los organismos viables no cultivables, requiere el desarrollo de nuevas metodologías que identifiquen a ambos grupos de organismos. Por lo que, se han desarrollado técnicas moleculares que son independientes de cultivo y se usan para identificar a bacterias cultivables y no cultivables. Estos métodos se caracterizan por ser métodos rápidos y precisos, que se dirigen a caracterizar e identificar regiones específicas de los ácidos nucleicos como el 16S rDNA. Tales métodos son la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR Tiempo Real, Hibridación In Situ Fluorescente (FISH), Análisis del Espacio Intergénico del rRNA (RISA), Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizarte (DGGE), Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE), y Secuenciación (Díaz y Wacher, 2003; Amann *et al*., 1992; Olmos, 2003).

Basándose en lo anterior se plantea la siguiente premisa de trabajo: conforme se va desarrollando el cultivo de *Litopenaeus vannamei* las condiciones ambientales del cultivo se alteran, pudiendo ocasionar diferentes estados de estrés en los organismos, lo que puede llevar a un cambio en la diversidad bacteriana presente. Estos cambios en la flora bacteriana podrían llevar a relacionar y determinar qué grupos bacterianos fueron los responsables de las

enfermedades en el camarón, llevando con esto a conocer y prevenir las patologías.

De acuerdo a lo anterior, este trabajo pretende identificar a los principales grupos bacterianos presentes en el desarrollo de un cultivo semi-intensivo de *Litopenaeus vannamei* utilizando técnicas moleculares como FISH y PCR. Con FISH se identificará la comunidad bacteriana metabólicamente activa y con PCR se identificará la comunidad bacteriana total presente en varios tejidos de camarón.

# ANTECEDENTES

La camaronicultura, es una de las industrias alimentarias que presentan un gran dinamismo y rentabilidad en el mundo, sin embargo sigue siendo una actividad de alto riesgo debido al desarrollo y diseminación de enfermedades, que repercuten fuertemente en la economía de la industria del camarón. Siendo necesario el desarrollo de métodos que permitan obtener un diagnostico rápido y preciso de la enfermedad, así como ampliar el conocimiento de los microorganismos patógenos, saprofitos o oportunistas que se encuentran en el entorno que rodea al camarón (Olmos, 2003). Esto trae consigo, beneficios directos en la detección temprana de los posibles agentes etiológicos de la enfermedad en la población y en el ambiente, donde se lleva a cabo el cultivo (Hernández, 2000; Martínez, 1999).

***I. Enfermedades bacterianas en organismos marinos cultivables***.

En camarones *Peneidos,* se ha aumentado el reporte de enfermedades causadas por bacterias, en la mayoría de los casos se ha encontrado bacilos motiles, gram negativos, oxidasa positivos, fermentadores (Lignher, 1975). Las especies principales son los *Vibrios*, usualmente *V alginolyticus*, *V. parahemolyticus.* Algunos otros bacilos gram negativos como *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp*. y *Flavobacterias* (Sinderman y Lightner, 1988), son ocasionalmente relacionados en las patologías bacterianas en camarones.

Formando parte casi todos estos microorganismos de la microflora normal de estos animales. (Sindermann y Lightner, 1988; Yasuda y Kitao, 1980; Vanderzant, *et al*., 1970).

Se han encontrado dos formas principales de infecciones bacterianas en camarón, a nivel de caparazón. Una es la enfermedad de Shell o de la mancha café, que ocasiona áreas carcomidas cafés o negras en la cutícula de todo el cuerpo, producidas por bacterias que secretan lipasas, proteasas y quitinasas, que pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Spirillium* y *Flavobacterium* (Lignher, 1975; Martínez, 1999). Otra de las enfermedades es la formación de crecimientos filamentosos en la superficie del cuerpo, específicamente en pleopódos, periópodos y branquias, ocasionada por la bacteria filamentosa *Leucutrix mucor* que es el agente principal y otros géneros como *Thiotrix sp.*, *Flexibacter sp., Cytophaga sp* (Martínez, 1999). Las heridas al quedar expuestas se complican con otras enfermedades bacterianas ocasionando septicemias o la muerte.

Estos padecimientos son secundarios, ya que resultan de una lesión primaria ocasionada por otro agente causal; como parásitos, hongos, nutrición inadecuada, exposición a productos químicos, estrés, o traumas físicos por mal manejo.

Existen otros padecimientos que se han detectado en larvas de camarón cultivado como son: el síndrome de la gaviota y la enteritis hemocítica, que están asociados con *Vibrio spp*; la hepatopancreatitis necrotizante, asociada con

bacterias intracelulares similares a las ricketsias (Loy *et al*., 1996). Una de las enfermedades más comunes en los laboratorios productores de larvas, en Ecuador, es el síndrome de bolitas, cuyo agente etiológico es *Vibrio harveyi*, asociado a grandes mortalidades de larvas de *Penaeus vannamei* y de *P. stylirostris* (Zherdmant, 1991).

Mundialmente las enfermedades ocasionadas por bacterias del género Vibrio son importantes en peces (Muroga, 1975; Austin y Austin, 1993), y en camarones marinos (Lightner y Lewis, 1975, Lightner, 1994; Mohney *et al*., 1994), porque causan verdaderos estragos, aunque sólo ciertas especies son patogénicas, otras pueden ser inocuas o actuar sólo como invasores secundarios. Entre las especies del género Vibrio consideradas de importancia sanitaria en acuicultura se pueden mencionar: *V. anguillarum*, *V. campbelli, V. damsela, V. harveyi, V. orientalis, V. alginolyticus, V. vulnificus*, entre otras (Inglis *et al.,* 2001; Sindermann, 1988; Arce, 2002).

### *II. Comunidades bacterianas*

Históricamente, ha sido muy difícil determinar la comunidad bacteriana presente en los ecosistemas naturales. Las pruebas clásicas para identificar bacterias en muestras ambientales han sido técnicas dependientes del cultivo microbiano y diferenciación con las características morfológicas y bioquímicas del microorganismo (Moter y Göbel, 2000; Lane *at al*, 1985). Sin embargo, estos métodos no reflejan la totalidad de la comunidad bacteriana. Según Frischer y

colaboradores (1996), la fracción cultivable de bacterias es generalmente menos del 1% del número total de células bacterias presentes en el medio. Además, después de algunas generaciones pueden perderse sus características fisiológicas originales o tener cambios genéticos (Theron y Cloete, 2000).

Así mismo, se han empleado técnicas con anticuerpos que permiten la identificación directa y enumeración de bacterias individuales de muestras ambientales. Estos utilizan anticuerpos específicos contra marcadores de la superficie (Theron y Cloete, 2000). A pesar de tener más ventajas, estas técnicas presentan limitaciones, debido a que la producción de anticuerpos es costosa e implica tiempos prolongados para producir los volúmenes necesarios. Además, se requiere la producción de un cultivo puro del organismo de interés, lo cual es difícil de obtener a partir de células viables pero no cultivables.

Por lo tanto, se han desarrollando técnicas que eviten el cultivo de células bacterianas, aumentando nuestro conocimiento de la abundancia y distribución microbiana presente en la naturaleza. Haciéndose posible la identificación directa de células, lo que permite conocer el número exacto de bacterias presentes en una comunidad.

### *III. 16S rRNA/rDNA como marcador molecular*

Los métodos convencionales para identificar y enumerar bacterias de muestras ambientales, no reflejan la estructura de la comunidad bacteriana total y los datos obtenidos no aportan información completa para estudios de relaciones

filogenéticas y de evolución (Lane *et al*, 1985; Olsen *et al*, 1986). Entre los métodos que hacen posibles la identificación y enumeración directa de las células, se encuentran los ensayos con enzimas de alta sensibilidad, análisis de lípidos y ácidos grasos, detección inmunológica de antígenos especie-específicos (Frisher *et al*., 1996), técnicas con anticuerpos fluorescentes (Theron y Cloete, 2000), y actualmente la secuenciación de los genes 5S rDNA, 16S rDNA y 23S rDNA (Barry *et al*, 1991).

Los análisis comparativos de las secuencias del 16S rDNA han sido usados para inferir las relaciones evolutivas y formas de vida celular, así como para conocer la diversidad genética y la relación entre un cierto grupo de organismos (Nishimura *et al*., 1993); también ha facilitado la identificación de microorganismos no cultivables (Eisen *et al*., 1992).

El uso del rRNA/rDNA para el análisis de las poblaciones microbianas naturales presenta la ventaja de poseer secuencias altamente conservadas (universales), y secuencias variables (específicas) entre especies y grupos (Gray *et a*l, 1984; Olsen *et al*, 1986). Su ocurrencia es otra razón, ya que un gran número de copias (más de mil) en una célula viva (Theron y Cloete, 2000) hace más fácil su detección. Según Giovannoni (1988), un número de 1,000 a 10,000 rRNA se encuentran en células metabólicamente activas, lo que facilita la detección de células y la diferenciación entre células activas e inactivas o muertas (Amann *et al*., 1995).

La secuenciación del 16S y 23S rDNA se ha convertido en el estándar de "oro" para la identificación definitiva de bacterias, por lo que se han establecido grandes bases de datos. La formación de bases de datos ha llevado a una rápida colocación de nuevas secuencias dentro del mismo marco de clasificación. También se han realizado cambios recientes en la nomenclatura en el rango más alto de la taxonomía de procariotas. Por su parte Manz y colaboradores en 1992, diseñaron y evaluaron oligonucleótidos específicos para el rRNA de las subclases $\alpha$, $\beta$ y $\gamma$ de las *Proteobacterias,* además de la aplicación de marcaje fluorescente para la hibridización de células, sugiriendo que esta metodología puede ser usada para estudios determinativos y monitoreo *in situ* de la distribución poblacional y la dinámica en las comunidades microbianas.

La examinación de colecciones de secuencias del 16S rRNA reveló a Giovannoni y colaboradores en 1988 la presencia de dominios de secuencias que son únicos para las tres líneas primarias de la descendencia celular: *Arqueobacterias*, *Eurobacterias* y *Eucariotes*. Ellos llevaron a cabo el experimento desarrollando oligodeoxinucleótidos complementarios a los dominios de las secuencias conservadas. Según estos autores, es posible identificar una sola célula microbiana, debido a que las células que están creciendo pueden contener $10^4$ ribosomas, lo que lo hace un blanco potencial para estudios de diversidad bacteriana.

## *IV. Pruebas moleculares FISH y PCR*

La técnica de FISH utiliza métodos no radiactivos como la hibridación fluorescente *in situ* que son sensibles y rápidos para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos, los cuales utilizan oligonucleótidos dirigidos al rRNA marcados fluorescentemente. Debido a la gran abundancia del rRNA la unión de los oligonucleótidos fluorescentes al rRNA de las bacterias son fácil de detectar en el microscopio de epifluorescencia, por lo cual, se puede usar una variedad de sondas y observarlas en el mismo campo microscópico.

Las principales ventajas de la técnica de FISH incluyen: detección de células individuales en medios complejos, la clasificación y identificación filogenética de las bacterias, la estimación de la activad metabólica *in situ* y la detección de las bacterias viables pero no cultivables (Olmos, 2003 y Hernández, 2000).

El origen de la metodología de FISH, fue a partir de la técnica de hibridación *in situ* (ISH). La cual fue independientemente desarrollada por 2 grupos de investigadores en el año 1969 (Pardue *et al*, 1969; John *et al*., 1969). ISH fue ampliamente utilizado en estudios de evolución cromosómica de tumores y leucemias, y en estudios citogenéticos de un amplio rango de especies (Moter y Göbel, 2000).

Giovannoni y colaboradores en 1988, fueron los primeros en utilizar oligonucleótidos marcados fluorescentemente para la detención de una célula microbiana.

En el mismo año Braun y colaboradores desarrollaron un método rápido para la identificación de células bacterianas, utilizando sondas marcadas fluorescentemente dirigidas al 16S rRNA. En donde evaluaron algunos efectos como la intensidad del marcaje, tiempo de almacenaje, tipo de fijación, tiempo de tratamiento con metanol/formaldehído y tiempo de tratamiento con borohidrato. Usaron una variedad de microorganismos gram positivos y gram negativos como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*., *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas testosterona* y *Staphylococcus aureus*. Por lo que, los autores concluyeron que este método se puede aplicar a muestras ambientales, que comprenden diversos tipos celulares que frecuentemente son almacenados previos a la examinación.

Las pruebas de oligonucleótidos fluorescentes se han utilizado para detectar *Vibrio cholerae* en agua de mar con concentraciones bajas de bacterias. Nishimura y colaboradores (1993) realizó una combinación de esta técnica con DVC (Conteo Variable Directo) para incrementar el contenido de rRNA intracelular en bacterias, haciendo posible detectar fácilmente bacterias diminutas. Paralelamente, para cuantificar la concentración de bacterias, se usó la técnica de filtración, en lugar de citología. Esta combinación fue capaz de detectar y enumerar células bacterianas particulares directamente de muestras naturales, posteriormente se aplico en muestras de mar.

Distel y Cavanaugh (1994) examinaron la simbiosis encontrada en agallas de mejillón con bacterias metanotróficas. Sugiriendo que estos estudios pueden ayudar a evaluar las alternativas de simbiosis y que pueden aclarar importantes aspectos respecto a la simbiosis eucariote/procariote ontogénica y evolutivamente.

La carencia de estudios relacionados con estructura microbiana, debido a las limitaciones de las técnicas tradicionales de identificación y enumeración, así como la falta de medios selectivos, aislamiento de cultivos puros, entre otros, hace que la ecología de poblaciones microbianas y comunidades en sistemas anaeróbicos permanezcan sin explorar. Basándose en esto Raskin y colaboradores (1994), diseñaron ocho oligonucleótidos complementarios a las secuencias conservadas del 16S rRNA de grupos definidos filogenéticamente como metanógenos, para ser usados en pruebas de hibridización en el estudio de microbiología ambiental y determinativa.

Posteriormente Frischer y colaboradores (1996), publicaron la importancia de la localización de la secuencia blanco dentro de la molécula de rRNA y definieron criterios que deben tomarse en cuenta para el diseño de la sonda. Este grupo diseñó diferentes sondas dirigidas a sitios específicos del 16S rRNA, que permiten diferenciar diversos grupos de *Eubacterias*. La principal clase estudiada fue la de *Proteobacterias* que incluye diferentes subclases como son las *Proteobacterias* $\alpha$, $\beta$, $\gamma$, $\delta$ y *Proteobacterias* entéricas. La técnica de hibridización *in situ,* ha sido usada en bacterias fisiológicamente activas,

organismos cintróficos (Zarda *et al*., 1997), y en bacterias endosimbiontes (Zarda *et al*., 1997; Distel y Cavanaugh, 1994), así como, en medios ricos en nutrientes como lodos activados (Zarda *et al*., 1997; Snaidr *et al*., 1997), en donde la mayoría de las bacterias pueden ser detectadas. También se ha utilizado para monitorear comunidades bacterianas de ecosistemas acuáticos, sedimentos activados (Snaidr *et al*., 1997; Amann *et al*., 1990), tierra (Zarda *et al*., 1997), identificar cromosomas específicos en humanos (Pinkel *et al*., 1988) y para detectar e identificar bacterias del ácido láctico en leche a nivel industrial (Matte *et al*., 2001). Así como, para identificar endosimbiontes en bivalvos (Hernández y Olmos en prensa).

Los procariotas presentan en su genoma el gene 16S rDNA que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal, el cual es usado como el biomarcador más importante para identificación de bacterias.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es usada para amplificar el gene 16S rDNA de comunidades naturales para análisis de poblaciones bacterianas, utilizando oligonucleótidos específicos para los microorganismos a determinar. El desarrollo de esta técnica ha permitido estudiar la diversidad microbiana de diferentes ecosistemas sin necesidad de crecer las células en medios de cultivo (Hernández, 2000; Olmos, 2003), también permite la identificación de un organismo que se encuentra en mezcla de poblaciones (Reysenbach *et al*., 1992).

Desde que Colwell y colaboradores (1985) reportaron que algunos *Vibrio cholerae* 01 presentes en muestras ambientales no pueden crecer en medios sintéticos usados en el laboratorio, se ha revolucionado el concepto en la ecología de los organismos (Karunasagar *et al.,* 1995). Debido a la importancia de detectar formas no cultivables de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales. Karusanagar y colaboradores (1995) consideraron la posibilidad de usar PCR para la detección de *Vibrio cholerae* en alimentos marinos. Para ello se detecto el gene *ctx* que codifica el .factor de virulencia más importante de *Vibrio cholerae*. Los resultados sugirieron que la técnica basada en PCR tendría un gran potencial para la detección de *Vibrio cholerae* en alimentos marinos y en la detección de otros organismos. Koch y colaboradores (1993) también usaron PCR para identificar *Vibrio cholerae* en alimentos.

Reysenbach y colaboradores (1992), utilizaron la técnica de PCR para identificar genes de rDNA usando una mezcla de DNA purificado de dos cepas de *Arqueobacterias* hipertermófilas GE5 y AL2, y la levadura *Saccharomyces cereviciae*. En otro trabajo realizado por Marchesi y colaboradores (1998), diseñaron y evaluaron oligonucleótidos para PCR, probando su especificidad y eficacia con una variedad de especies de bacterias y muestras ambientales como agua de mar, sedimento, bacterias orales y bacterias aisladas de biopelículas.

# JUSTIFICACIÓN

La necesidad de ampliar el conocimiento acerca de comunidades y especies bacterianas presentes en un cultivo de camarón y las alteraciones que se pueden presentar en la diversidad bacteriana, con relación a los cambios del ambiente. Lleva a la búsqueda de nuevas metodologías que nos permitan la identificación rápida y precisa de las poblaciones bacterianas que pueden estar asociadas a los cultivos semi-intensivos de *Litopenaeus vannamei,* sin recurrir a los cultivos bacterianos. Esto con el fin de poder, en un futuro, conocer las patologías más importantes originadas en los cultivos de camarón y al mismo tiempo controlar la diseminación de enfermedades en la acuicultura. Por lo que el desarrollo de nuevos métodos y técnicas que nos permitan obtener un diagnostico rápido o tomar medidas profilácticas enfocadas a la prevención y control de enfermedades bacterianas traerá como consecuencia directa beneficios en la producción de camarón.

# OBJETIVO GENERAL

Identificar y determinar la diversidad bacteriana presente en diferentes tejidos de camarón *Litopenaeus vannamei* de un cultivo semi-intensivo, mediante la aplicación de técnicas moleculares de FISH y PCR que incluyan a los grupos bacterianos metabólicamente activos y no activos.

# OBJETIVOS PARTICULARES

- Aplicar la técnica de FISH para identificar la composición bacteriana metabólicamente activa en muestras de tejidos (hepatopáncreas, branquia e intestino) de camarón cultivado.

- Aplicar la técnica de PCR para analizar la presencia de la comunidad bacteriana en muestras de tejidos de camarón cultivado.

- Caracterizar e Identificar morfológica y molecularmente las especies dominantes de cianobacterias en tejido de camarón.

# MATERIALES Y MÉTODOS

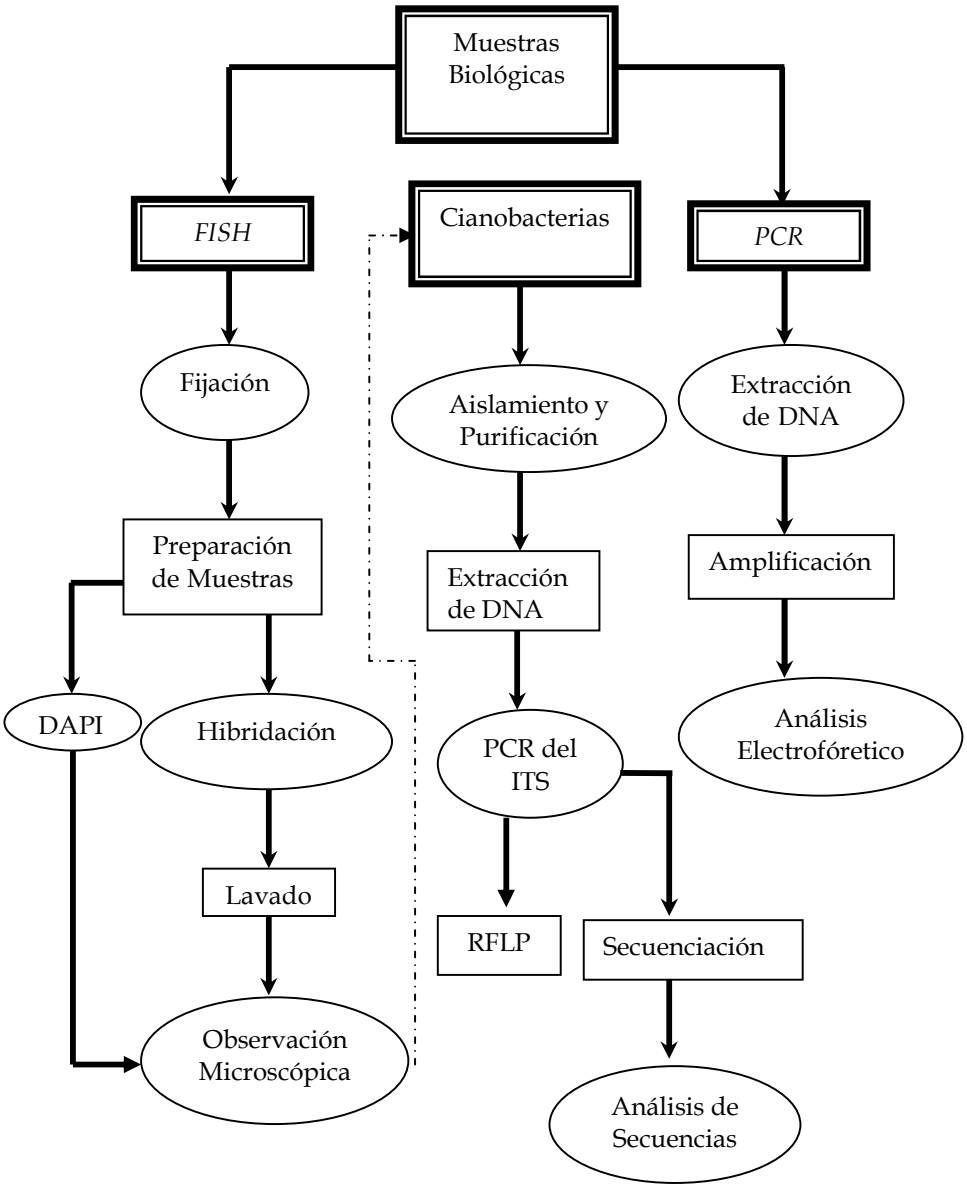


Figura 1. Descripción de la estrategia experimental, seguida para realizar la identificación de la diversidad bacteriana en camarón *Litopenaeus vannamei.*

***I. Recolección y disección de organismos.***

En la figura 1 se muestran las metodologías generales utilizadas para el desarrollo del presente trabajo, las cuales serán descritas más específicamente en los siguientes puntos a tratar.

La colecta de las muestras se llevó a cabo durante el desarrollo de un cultivo semi-intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en la granja Viszomar ubicada en la localidad de San Felipe, Baja California, México. Se tomaron muestras de organismos de los estanques 6, 7, 8, 9 y 10, en la puerta de salida del agua, con el fin de tomar el punto mejor representado de todo el estanque.

Se llevaron a cabo tres muestreos durante el ciclo de cultivo (Tabla I), con el objetivo de observar si se presentaban cambios en la composición y dominancia de los grupos bacterianos conforme al desarrollo del cultivo, monitoreando la temperatura, edad del cultivo y etapa de crecimiento de los organismos.

Tabla I. Etapas de crecimiento del camarón y temperatura de los estanques en los 3 muestreos realizados.-

| Toma de Muestra | Fecha | Etapa de Crecimiento | T° del Estanque |
|---|---|---|---|
| 1 | 12/Junio/2002 | Juvenil (1.5 - 2.0 gr) | 25 °C |
| 2 | 16/Julio/2002 | Adulto (5.5 - 6.0 gr) | 32 °C |
| 3 | 31/Agosto/2002 | Adulto (12 gr) | 36 °C |

Para realizar la identificación de la diversidad bacteriana por FISH, los organismos fueron disectados para obtener los tejidos del hepatopáncreas, branquia e intestino. El procedimiento se llevó a cabo en charolas de plástico mantenidas en hielo para evitar la degradación del tejido por la acción enzimática. Los tejidos se colocaron de tres en tres, en tubos cónicos de 50 ml con 5 ml de formaldehído al 6% para llevar a cabo la fijación y preservación del tejido.

Para la identificación de la diversidad bacteriana por PCR los organismos fueron congelados a -70 ºC en bolsas individuales hasta su uso.

### *II. Identificación de la diversidad bacteriana por FISH*

Para la hibridación del gene 16S rDNA se utilizaron los oligonucleótidos grupo y género específicas reportadas por Braun *et al*, 1992. Los cuales son específicos para los siguientes grupos: *Proteobacterias* que incluyen a los grupos $\gamma$, $\acute{\alpha}$ y $\delta$*;* las bacterias gram positivas Altas y Bajas en G+C (Tabla II).

II.1. Cultivos bacterianos

Las cepas bacterianas utilizadas como control, fueron *Bacillus subtilis* BB80 y *E. coli*. JM109. Estas cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37ºC, con agitación continua a 300 rpm, en un agitador orbital (Mod. 3525, Lab-Line Instruments, Inc.). Se monitoreo su crecimiento para tomar la muestra y al igual que para las muestras biológicas se fijaron y preservaron con formaldehído al 6%.

Tabla II: Oligonucleótidos utilizados para la identificación bacteriana por FISH. La tabla muestra la secuencia de cada oligonucleótido grupo-especifico utilizado, el fluorocromo que fue añadido a cada sonda y las longitudes de onda en las que emiten (ex) o absorben (em) luz.

| **GRUPO BACTERIANO** | **SONDA OLIGONUCLEOTIDA** | **FLOUROCROMO/ COLOR EMITIDO (ex/em)** |
|---|---|---|
| *Proteobacterias* α | CGG-GGC-CGA-TTG-AGA-GC | Cianina Cy5: rojo (643/667) |
| *Proteobacterias* δ | GGA-GAA-CGA-TAC-GTT-TCG | Carboxirodamina 6G: (524/557) |
| *Proteobacterias* γ | TCA-CCC-GAA-CGT-TCG | Carboxi-X-Rodamina: Anaranjado (576/601) |
| Bacterias gram (+) Bajas en G + C | ACG-GTC-TAT-AGT-CCC | Carboxi-X-Rodamina: Anaranjado (576/601) |
| Bacterias gram (+) Altas en G + C | ATA-CTG-GAA-CCC-GAT-GT | Carboxi-X-Rodamina: Anaranjado (576/601) |

## II.2. Preparación de muestras.

Las muestras fijadas con formaldehído se maceraron y sonicaron por un tiempo de 30 segundos con pulsaciones cada tres segundos, con el fin de romper y disgregar el tejido, manteniendo las muestras en hielo.

Se tomaron 500 µl del tejido homogenizado y se colocaron en tubos eppendorff de 1.5 ml estériles, los cuales fueron centrifugados durante 8 minutos a 14000 rpm para obtener el botón celular, el cual fue lavado dos veces con 1 ml de PBS, centrifugando 14000 rpm en cada lavado. Posteriormente el botón celular obtenido se resuspendió en 1ml de PBS. Se homogenizó con vórtex y se

colocaron 15 µl en un portaobjetos gelatinizado (Anexo 1) distribuyendo la gota en todo el pozo cuidadosamente con ayuda de una punta de pipeta. Las laminillas se secaron por aproximadamente 40 minutos a 37°C, en una incubadora.

Las laminillas secas se trataron con solución de fijación (etanol/formaldehído (90/10 V/V)) por una hora, colocando las laminillas en un contenedor (tren de tinción) que se introdujo en una cámara de vidrio, con el fin de realizar la fijación del tejido. La solución de fijación ayudó a permeabilizar las membranas celulares para una mejor penetración de la sonda marcada.

Después de la fijación las laminillas son secadas colocándose sobre papel secante y lavadas dos veces con agua destilada, finalmente las laminillas se colocaron en gradillas con papel secante y se pusieron a secar por 40 minutos a 37°C. En este paso las sondas están listas para realizar la hibridación.

II.3. Hibridación con la sonda fluorescente*.*

Para llevar a cabo la reacción de hibridación se colocó una gota de la solución de hibridación conteniendo la sonda a una concentración de 1 ng/µl (Hernández, 2000) en cada pozo del portaobjetos, los cuales se colocaron en una cámara de hibridación a 37°C por toda la noche. A partir de este momento se maneja todo en oscuridad para evitar exponer el fluorocromo.

Pasado el tiempo de hibridación se retiró la solución de hibridación de cada pozo con una pipeta, los portaobjetos se colocaron de nuevo en la cámara de

hibridación, se prosiguió a lavar 2 veces por 20 minutos con solución de lavado (Buffer SET 1X) previamente calentada a 37°C.

Al término de los lavados se continuó con el proceso de secado de los portaobjetos, los cuales son colocados en trenes de tinción y puestos en la incubadora a 37°C por 30 minutos, manteniendo las condiciones de oscuridad.

II.4. Tinción con DAPI

Las muestras biológicas y las cepas control, también se tiñeron con DAPI (4'6-diamidino-2 fenilindo) con el objetivo de confirmar y semi-cuantificar la presencia bacteriana. Las muestras ya fijas en los portaobjetos especiales, se les agregó 15 µl de DAPI (7.75 µg/ml) y se incubaron en la oscuridad por 5 minutos.

II.5. Observación al microscopio de epifluorescencia.

La observación microscópica de las muestras se realizó con el microscopio Olympus BX60 el cual consta de la cámara Cool Swap-Proct Olympus U-TVO-5XC, y Image-Pro Plus, para analizar y almacenar los resultados.

Para llevar a cabo la observación microscópica se agregó 15 µl de fluido de montaje (Anexo 2) en cada pozo de los portaobjetos especiales, se colocó un cubreobjetos, quedando la muestra lista para observarse al microscopio.

Las laminillas preparadas, sin oligonucleótido se utilizaron como controles de autofluorescencia de las muestras de tejido.

La observación se realizó tomando 10 campos del pozo en un orden alternado realizando la observación en la dirección que se muestra en la figura 2.

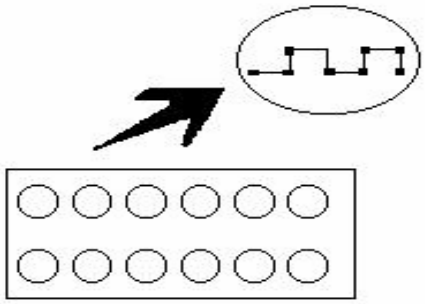

Figura 2. Diagrama esquemático para la observación microscópica de muestras en portaobjetos especiales. Los puntos negros indican el campo donde se tomo la foto

***III. Análisis cuantitativo.***

La enumeración bacteriana se realizó de forma semi-cuantitativa, basándose en la observación de señales de fluorescencia por campo, de tal modo que se observaron 10 campos en cada pozo y se sacan porcentajes, donde el 100 % se obtuvo de observar la señal de fluorescencia (o señal positiva) en 10 campos.

***IV. Identificación de la diversidad bacteriana por PCR***

Para realizar la identificación por PCR, primero se llevo a cabo el aislamiento de DNA total (Anexo 3) de los 3 tejidos de camarón, de los estanques

6,7 y 8. Además se extrajo DNA de cultivos bacterianos (*B.subtilis* y *E.coli*) el cual se utilizó como control positivo o negativo de la amplificación, utilizando el método tradicional para la extracción.

Una vez realizada la extracción de DNA cromosomal se prosiguió con la cuantificación por espectrofotometría de luz ultravioleta de las moléculas de DNA. Para esto se realizó una dilución 1:500 y se leyó la absorbancia de la solución de DNA a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración y pureza del DNA fueron calculadas de acuerdo a los protocolos reportados por Sambrook y colaboradores (1989).

La calidad del DNA extraído se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, llevándose a cabo en una cámara horizontal (C.B.S. Scientific Co.), utilizando el amortiguador TBE IX. El gel fue teñido con bromuro de etidio (25 µg/ml), se observó y fotografió sobre un transiluminador de luz ultravioleta a 302 nm (Mod LMS-20E, UVP.Inc.) empleando un sistema digital y papel térmico.

IV.1 Amplificación por PCR

Para la amplificación del gene 16S rDNA se utilizaron los oligonucleótidos de grupo como iniciador antisentido, mismos que se utilizaron en la identificación por FISH y el oligonucleótido universal como iniciador sentido (Tabla III).

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la identificación bacteriana por PCR. La tabla muestra las secuencias de cada oligonucleótido grupo-especifico utilizado, su tamaño y la Tm correspondiente

| **GRUPO BACTERIANO** | **SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO (Reverse)** | **LONGITUD (pb)** | **Tm ºC** |
|---|---|---|---|
| *Proteobacterias* γ | TCA-CCC-CAR-TTG-CCT | 1450 | 54 |
| *Proteobacterias* ά | CGG-GGC-CGA-TTG-ARG-C | 500 | 48 |
| *Proteobecterias* β | CYG-CAC-ATC-GTC-ACT | 750 | 64 |
| *Proteobacterias* δ 1 | GGA-GAA-GAA-CTT-CTG | 230 | 44 |
| *Cytophaga / Flavobacteria* | GGG-GGT-GTG-ACC-TAG-AGT | 300 | 58 |
| Bacterias gram (+) Altas en G + C | ATA-CTG-GAC-CCG-ATG-T | 700 | 46 |
| Bacterias gram (+) Bajas en G + C | ACG-CGT-CTA-TAG-TCC | 1200 | 56 |
| *Bacillus sp.* | CCA-GTA-ACC-TTT-GAC-CC | 600 | 55 |
| *Pseudomonas* sp. (especiesfluorescentes) | TTC-AAC-CCT-CCT-TCC | 500 | 51 |
| **NOMBRE** | **SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO (Forward)** | **LONGITUD (pb** | **Tm ºC** |
| Bseg (Universal) | GAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TC | | 55 |

La reacción de amplificación se realizó con base a las instrucciones del Kit para PCR marca invitrogen. Se prepararon en tubos Eppendorf de 0.5 ml, las siguientes mezclas de reacción: 5 µl de solución amortiguadora (buffer 10X), 1 µl de la mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.5 µl (1.5 mM) de cloruro de magnesio, 1 µl del iniciador universal (5'), 1 µl del iniciador grupo y

genero especifico (3'), 2 µl de ADN (1 µg/µl), 38.25 µl de agua y 0.25 µl de enzima TaqDNA.

La mezcla fue colocada en un termociclador GeneE (Techne, Inc), utilizando un programa de 25 ciclos (Tabla IV)

Tabla IV. Programa de tiempos y temperaturas de amplificación por PCR

| **Programa** | **T°/t** | | **Ciclos** |
|---|---|---|---|
| Desnaturalización inicial | 95ºC | 6 min | 1 |
| Desnaturalización | 95ºC | 1 min | |
| Alineación | *TmE | 1 min | 25 |
| Extensión | 72ºC | 2 min | |
| Extensión final | 72ºC | 10 min | 1 |

*TmE. Temperatura de alineación especifica para cada oligonucleótido

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5 % (procedimiento mencionado anteriormente)

### *V. Aislamiento y cultivo de cianobacterias*

Se tomó un camarón del estanque 6 y se extrajo el hepatopáncreas, se colocó en 500 µl de agua de mar estéril, se homogenizó manualmente con pistilo y con vórtex. Del homogenizado se inocularon 50 µl en cajas con medio sólido y 200 µl en 3 ml de medio líquido, para lo cual se utilizó medio F/2 (Guillard, 1962)

(Anexo 4). Los cultivos sólidos y líquidos se pusieron a crecer en fotoperíodo (12 horas luz-12 horas oscuridad) a una intensidad de 30 μEm-2s-1 y un intervalo de temperatura entre 20-30 °C, donde permanecieron alrededor de 3 a 4 semanas. Las cajas inoculadas se observaron cada semana en el microscopio estereoscópico y los cultivos en líquido fueron analizados al microscopio óptico (olympus BX60), para de esta forma monitorear el crecimiento de las cianobacterias (Torres-Ariño, 2001).

Una vez crecidas las cianobacterias se prosiguió con el aislamiento de las especies, para lo que se probaron diferentes métodos según Rippka (1988) los cuales fueron:

Método de fototactismo: se colocó una muestra de cianobacterias en el centro de la placa con agar y se cubrió con papel oscuro, dejando un espacio por donde llegara la luz con el objetivo de separar las cianobacterias, ya que estas desarrollan sus filamentos hacia la fuente de luz.

Los filamentos mas separados del inóculo se tomaron cortando el agar de alrededor con una navaja estéril y colocándola en otra placa con medio fresco, de tal modo que la muestra quedara en contacto directo con el agar, llamándose a este el método del bloque invertido.

Separados los filamentos se tomó una muestra, se colocó en 3 ml de medio líquido y en fotoperiódo (12 horas luz-12 horas oscuridad) por alrededor de 3 semanas, con el objetivo de obtener cultivos unicianobacterianos.

## V.1. Caracterización morfológica.

Una vez aisladas las cianobacterias se siguió con la identificación morfológica con apoyo de la Dra. Elizabeth Ponce (comunicación personal), quién trabaja en esta línea de investigación. Para esto se tomaron muestra de los filamentos y se colocaron en portaobjetos, observándose a través del microscopio óptico en campo claro y contraste de fase.

## V.2. Caracterización molecular.

Para la identificación molecular de las cianobacterias se llevo a cabo el siguiente procedimiento: extracción de DNA cromosomal, amplificación por PCR de una región variable del gene que codifica para el 16S rRNA, el producto obtenido se purificó para ser secuenciado y a la vez sometido a digestión con la enzima de restricción *Hha* I que reconoce 4 nucleótidos, y poder comparar los patrones de restricción con los obtenidos por Lagunas (2003).

### V.2.1. Extracción de DNA cromosomal

Se purificó el DNA cromosomal de las cianobacterias aisladas, así como del tejido donde se aisló (hepatopáncreas, estanque 6 segundo muestreo), utilizando la metodología reportada por Golden (1988) y modificada por Lagunas (2003), la cual consiste en romper las células o filamentos por sonicación, seguido de un tratamiento con lisozima, detergente y proteinasa K, para asegurar el rompimiento

de las células. Para la extracción sé siguió el método tradicional con disolventes como el fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, para mayor detalle ver anexo 5.

Una vez realizada la extracción del DNA, se prosiguió con el análisis cuantitativo y cualitativo, como ya se menciono anteriormente en el apartado IV

V.2.2 Amplificación por PCR de los ITS

Para la amplificación de la región intergénica (ITS) de las cianobacterias se utilizaron los oligonucleótidos: cianol16sfinfor con la secuencia CTGGGGTGAAGTCGTAACAAG (Torres-Ariño, 2001) que híbrida en la parte final del gene 16S rDNA y el oligonucleótido ARNr 23S-ciano con la secuencia 5'GCTCTGTGTGCCTAGGTATC3', el cual híbrida con la parte inicial del gene 23S rDNA de cianobacterias (Wilmotte *et al*., 1993), con los cuales se esperaba un producto de entre 400 y 600 pb.

La reacción de amplificación se realizó con base a las instrucciones del Kit para PCR marca invitrogen. Preparando en tubos Eppendorf de 0.5 las siguientes mezclas de reacción: 5 µl de solución amortiguadora (buffer 10X), 1 µl de la mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.5 µl (1.5 mM) de cloruro de magnesio, 1 µl del iniciador (5'), 1 µl del iniciador (3'), 2 µl de ADN (1 µg/µl), 38.25 µl de agua y 0.25 µl de enzima TaqDNA .

Las muestras se colocaron inmediatamente en un termociclador Gene E (Techne). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones que se muestran en la tabla V.

Tabla V. Programa de tiempos y temperaturas de amplificación por PCR

| Programa | Tº/t | Ciclos |
|---|---|---|
| Desnaturalización inicial | 95ºC, 5 min | 1 |
| Desnaturalización | 95ºC, 1 min | |
| Alineación | 65ºC, 1 min | 35 |
| Extensión | 72ºC, 1 min | |
| Extensión final | 72ºC, 10 min | 1 |

Los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1.2 %.

V.2.3. Patrones de restricción de cianobacterias (RFLP)

Los productos amplificados de la región intergénica se digirieron con la enzima de restricción *Hhal*, la cual fue seleccionada basándose en un trabajo realizado en el laboratorio de biología molecular en CICESE (Laguna, 2003), donde identificaron cianobacterias del mismo sitio, basándose en análisis morfológicos y moleculares, teniendo patrones ya establecidos para cada una de las especies ya identificadas, sirviendo como patrón de comparación.

La reacción de digestión se preparó con 5 µl del producto de PCR, 1 µl de buffer 4Ne por cada 10 µl del volumen total de la reacción (3 µl), 1 µl de la enzima *Hhal*, llevando aun volumen final de 30 µl con 21 µl de agua mQ. Se mezcló y sé centrífugo rápidamente en la microcentrifuga y se colocó en un baño de agua a 37 ºC por 3 h, el tubo fue sellado con parafilm y tapa de seguridad para mantener las condiciones dentro del tubo.

Las muestras digeridas se analizaron en geles de acrilamida al 7.5 %, teñidos con Bromuro de Etidio (Anexo 6) Esto debido a la baja resolución de las bandas de bajo peso molecular en geles de agarosa.

V.2.4. Secuenciación.

Además, de los RFLP se amplifico el gene 16S rRNA, con el objetivo de identificar la especie aislada. Utilizando el oligonucleótido universal Bseg (Hernández y Olmos, en proceso) y el oligonucleótido especifico ARN 23S-ciano (Wilmotte *et al*., 1993). El producto de PCR se purificó (Anexo 7) y se envió a secuenciar.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

***. Análisis de la diversidad bacteriana por FISH.***

Para analizar la diversidad bacteriana por FISH, se utilizaron diferentes sondas previamente diseñadas y probadas en el laboratorio (Hernández, 2000). Las sondas fueron marcadas con tres diferentes fluorocromos: rojo-anaranjado, para los cinco oligonucleótidos analizados (materiales y métodos); verde para los grupos de *Sulfato Reductoras* (SRB) y *Pseudomonas* (PSM) y amarillo para el grupo de las *Proteobacterias* δ 1. En los resultados preliminares obtenidos con muestras de tejido y cultivos bacterianos, se obtuvieron mejores resultados con las sondas marcadas con el fluorocromo rojo-anaranjado. Estos resultados pueden deberse a que el fluorocromo rojo tenía mas estabilidad que los fluorocromos verde o amarillo, ocasionando señales de fluorescencia muy bajas o nulas con estos fluorocromos. Otra posibilidad es que estos grupos no se encontraban metabolicamente activos en las muestras analizadas y no se pudieron observar.

Una forma de analizar la diversidad bacteriana es a través del conteo bacteriano, ampliamente utilizado en estudios de diferentes tipos de muestras ambientales; agua de mar, lodos activados y biopelículas (Amann *et al*., 1995). Para conocer la dominancia numérica de las especies o grupos activos metabolicamente, los métodos mas utilizados son la filtración o citometria (Glöckner *et al*., 1999; Snaidr *et a*l., 1997; Amann *et al*., 1990), microscopía

electrónica de barrido con cortes histológicos y PCR tiempo real (Olmos, 2003), siendo esta última la forma mas precisa para realizar conteos bacterianos en tejidos cuando existe gran cantidad de bacterias.

En este trabajo la particularidad de las muestras (agrupadas o libres y en su mayoría intracelulares o unidas al tejido) no permitió realizar el conteo bacteriano exacto. Lo que dio como consecuencia la implementación de un método semi-cuantitativo para enumerar a las bacterias, el cual arrojó resultados que permitieron observar diferencias significativas entre los grupos analizados. Similar a lo reportado por Webster y colaboradores (2001) con la esponja *Rhopaloeides adoribile*, donde realizaron FISH de cortes de 10 µm de longitud, para localizar la distribución de las bacterias en la estructura de la esponja. Se identificaron una gran diversidad de grupos: *Actinobacterias*, bacterias Gram positivas Bajas en G+C, *Proteobacterias* β y *γ, Cytophaga/Flavobacterium*, bacterias verdes sulfurosas, bacterias verdes no sulfurosas, *Planctomycetes*, encontrándose en su mayoría en relación simbiótica.

I.1. FISH de cultivos bacterianos

Para probar la especificidad de los oligonucleótidos utilizados, se realizaron pruebas cruzadas entre los grupos, utilizando para esto cultivos bacterianos de *E.coli* JM109 y *Bacillus subtilis* BB80, los cuales fueron utilizados también como controles positivos (+) y negativos (-) de la reacción de hibridación. La figura 3, muestra la señal de hibridación de *E.coli* con la sonda para el grupo de las

*Proteobacterias* $\gamma$ y la de *Bacillus subtilis* BB80, con el grupo Gram (+) Bajas en G+C. A su vez, se realizaron pruebas cruzadas de cepas; *E.coli* con el grupo de las Gram (+) Bajas en G+C y *Bacillus subtilis* con el grupo *Proteobacterias* $\gamma$.

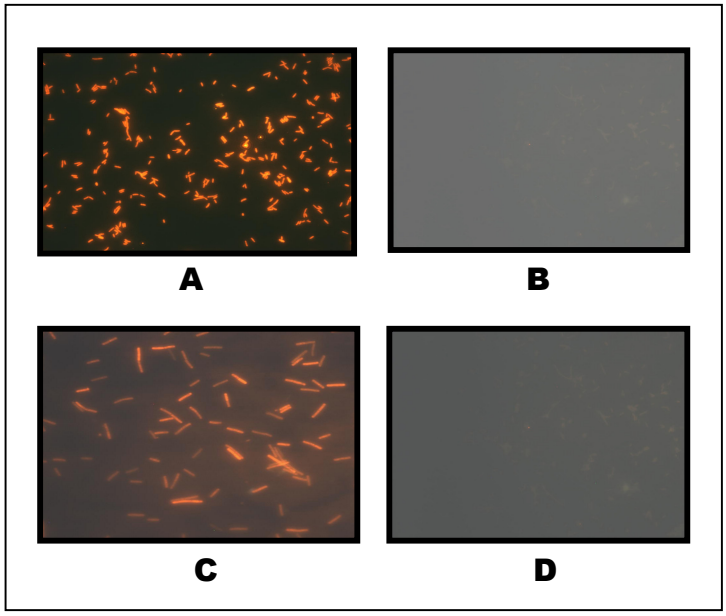


Figura 3. Análisis por FISH de los cultivos bacterianos, utilizados como controles positivos y negativos de los grupos Bajas en G+C y *Proteobacterias* $\gamma$*:* A) *E. coli* como control positivo del grupo de las *Proteobacterias* $\gamma$, B) *Bacillus subtilis* BB80 como control negativo del grupo de las *Proteobacterias* $\gamma$, C) *B.subtilis* BB80 como control positivo del grupo de las Gram (+) Bajas en G+C, D) *E.coli* como control negativo del grupo de las Gram (+) Bajas en G+C.

Debido a que las cepas fueron crecidas hasta la mitad de la fase exponencial, donde existe una mayor producción de ribosomas (Theron y Cloete,

2000), se obtuvo un patrón del estado metabólico en que se encontraban las células, el cual sirvió como punto de comparación para el análisis de las muestras de tejidos.

Otro control utilizado en las pruebas de hibridación, fue el de autofluorescencia, ya que está reportado que una de las limitaciones de la técnica de FISH es el fondo de autofluorescencia en muestras ambientales (Connally *et al*., 2002) producida por algunos microorganismos como levaduras, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Rhodospirillum centenum* y cianobacterias; así como restos de material orgánico e inorgánico con fluorescencia natural (Moter y Göbel, 2000). En el presente trabajo no se encontró señal de autofluorescencia con los controles realizados, por lo que podemos decir que se eliminó la posibilidad de obtener resultados falsos-positivos.

I.2. FISH en muestras de tejido de camarón.

Las figuras 5, 6 y 7 muestran los resultados obtenidos por FISH, con tejido de hepatopáncreas, branquia e intestino a través de los tres muestreos realizados. Las figuras muestran los oligonucleótidos utilizados, numero de estanque y el porcentaje de señal de fluorescencia observado. El análisis se realizó con el programa excel utilizando un gráfico de columna apilada, que compara entre los oligonucleótidos o grupo bacterianos, el aporte de cada valor al total obtenido (acumulativo).

El análisis por FISH para el tejido de Hepatopáncreas (Fig. 4), muestra en la figura 4A los resultados para el primer muestreo. En los resultados de los estanques 6 y 10, no se observó crecimiento activo en la flora bacteriana presente, ya que no se detecta la presencia de grupos bacterianos en las observaciones al microscopio. En el estanque 7, se observó al grupo de las Gram (+) Altas en G+C como dominante del nicho ecológico, ya que es el único grupo que presento señal de fluorescencia (20 %). En el estanque 8, se observó la presencia de dos grupos bacterianos: Gram (+) Altas en G+C y las *Proteobacterias* $\gamma$, con el 10 % de participación cada uno. En el estanque 9, se observó la presencia de tres grupos activos: las Gram (+) Bajas en G+C y Altas en G+C, asi como las *Proteobacterias* $\gamma$, los tres con la misma participación (10%), siendo el estanque con mayor numero de grupos presentes.

Este muestreo se realizó a un mes de haber iniciado el cultivo de camarón, por lo que los organismos tenían un peso de entre 1.5-2.0 gr y la temperatura registrada fue de 25°C.

La figura 4B, muestra los resultados para el segundo muestreo. El análisis muestra en el estanque 6, la poca o nula presencia de grupos bacterianos, comportamiento similar al primer muestreo. En el estanque 7 se observó la presencia de cuatro grupos bacterianos creciendo activamente en el mismo nicho ecológico, los cuales son: las Gram (+) Bajas en G+C y Altas en G+C, *Proteobacterias* $\delta$ y *ά,* alcanzando un porcentaje de participación total de 350 %. En el estanque 8 y 9 se observaron los grupos bacterianos Gram (+) Altas en G+C

y las *Proteobacterias* $\gamma$, $\delta$ y *ά*, con un porcentaje de fluorescencia casi igual. En el estanque 10 se encontró mayor desarrollo de grupos o crecimiento activo, estando los 5 grupos analizados presentes (Gram (+) Altas en G+C y Bajas en G+C, así como los grupos de las *Proteobacterias* $\gamma$, $\delta$ y *ά*), con el mismo porcentaje de fluorescencia los cinco, alcanzando un participación total de 500 %.

En el segundo muestreo los camarones ya estaban en la etapa de adulto con un peso de 5.5-6.0 gr. La temperatura aumentó a 32 ºC, con una diferencia de 7 ºC con respecto al primer muestreo.

La figura 4C, muestra los resultados para el tercer muestreo. Los resultados muestran en el estanque 6 un aumento en el número de grupos y en el porcentaje de fluorescencia a diferencia de la toma de muestra 1 y 2 en el mismo estanque. En los estanques 7 y 9, se observó una disminución en el número de grupos, así como en la participación de cada uno de ellos en comparación con los otros muestreos. Los grupos encontrados en ambos estanques son: Gram (+) Altas en G+C, *Proteobacterias* $\gamma$ y *ά*, siendo dominante el grupo Gram (+) Altas en G+C en ambos estanques. En el estanque 8 el grupo Gram (+) Bajas en G+C empieza a desarrollarse activamente, con una participación aproximada del 30 % y disminuye la participación del grupo de las *Proteobacterias* $\gamma$, comparando con el segundo muestreo. Los grupos Gram (+) Altas en G+C y los grupos de las *Proteobacterias δ* y *ά*, se mantienen con la misma participación que presentaron en el segundo muestreo. En el estanque 10 no se observó crecimiento activo de los grupos analizados, con un comportamiento igual que en el primer muestreo.

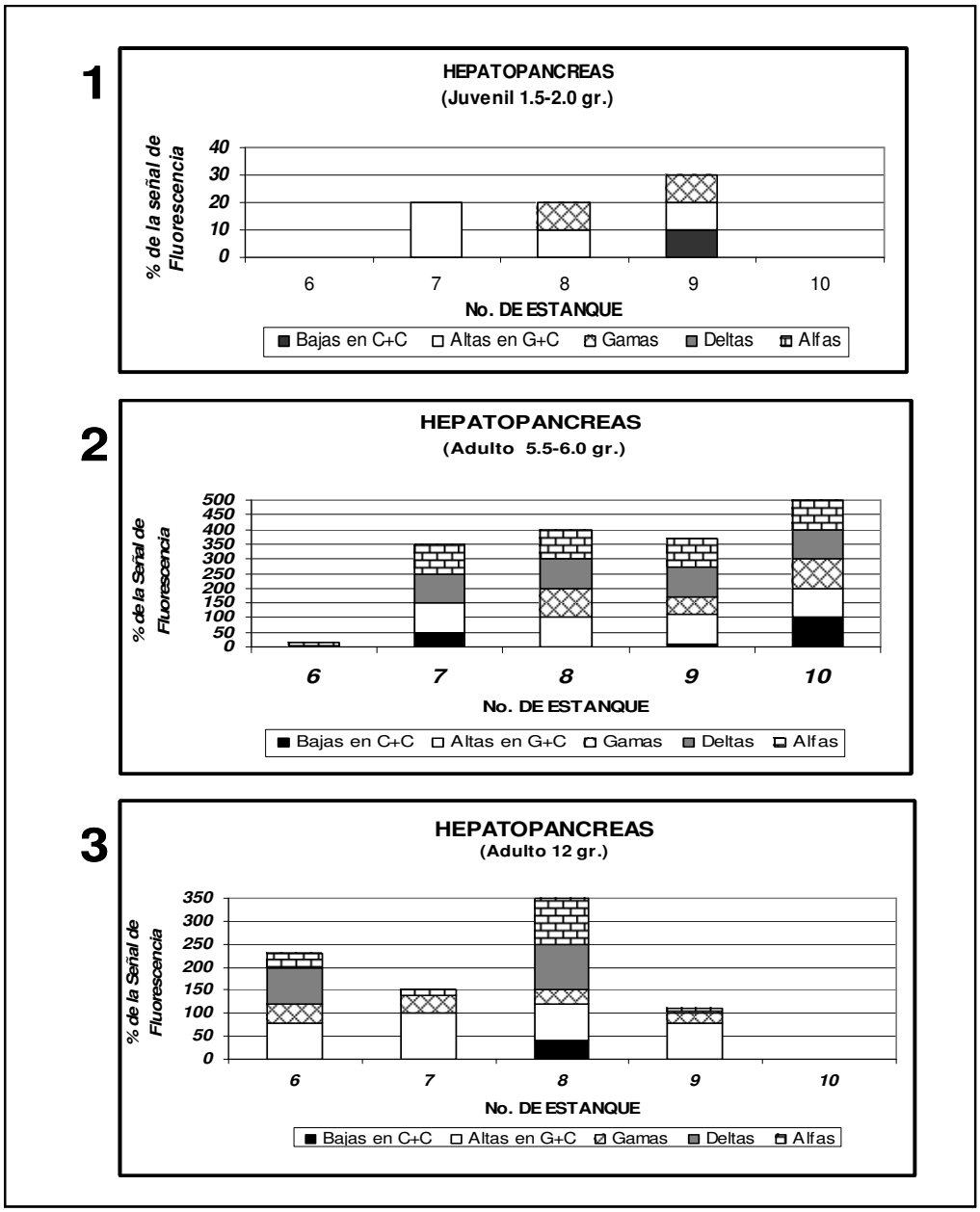


Figura 4. Análisis bacteriano por FISH de las muestras de hepatopáncreas, en los tres muestreos realizados durante el desarrollo del cultivo de camarón. El análisis muestra las etapas de crecimiento del camarón y la talla: 1) Juvenil (1.6-2.0 gr.), 2) Adulto (5.5-6.0 gr.), Adulto (> 12 gr.). Los 5 estanques analizados, los 5 grupos bacterianos analizados con los oligonucleótidos Altas en G+C, Bajas en G+C, y las *Proteobacterias* $\gamma$ (gamas), $\delta$ (deltas) y $\acute{a}$ (Alfas) y la participación de cada grupo en porcentaje de señal.

Las condiciones del cultivo en estas fechas habían cambiado en cuanto a calidad de agua y edad del cultivo, convirtiéndose en un cultivo maduro o viejo, donde se espera que el contenido de materia orgánica disuelta sea mayor. Datos obtenidos por los trabajadores de la granja, reportan en el primer muestreo un crecimiento masivo de cianobacterias en los estanques 9 y 10. Estos estanques fueron tratados con cal y desasolvados como tratamiento correctivo para eliminar cianobacterias, ya que existen reportes que son causa de envenenamiento en camarones (Whitton y Malcolm, 2000). El recambio de agua se realizó al 100 % (información proporcionada por los trabajadores de la granja), para evitar pérdidas por brotes de cianobacterias. En este tiempo la temperatura aumentó a 36ºC, marcando una diferencia de 4ºC en comparación con el segundo muestreo y de 11ºC con el primero. En esta etapa los camarones alcanzaron un peso de 12 gr.

Las comparaciones entre los 3 muestreos analizados por FISH para hepatopáncreas, muestran que en el primer muestreo existe una flora bacteriana con bajo porcentaje de participación de los grupos presentes (Gram (+) Altas en G+C y Bajas en G+C, así como *Proteobacterias* $\gamma$), indicando que la microflora presente se encuentra en estado basal de crecimiento. Además de no observarse grupos bacterianos metabolicamente activos en los estanques 6 y 10. En el segundo muestreo se observó la presencia de otros grupos, así como un aumento de casi el 100 % en su participación en los estanques 7, 8, 9, y 10, a diferencia del estanque 6. En el tercer muestreo se observó en los estanques 7, 8 y 9 una disminución en la presencia de grupos, así como en su participación. En el

estanque 8, aunque se muestra una disminución en la participación total de los grupos, se observó que el grupo Gram (+) Bajas en G+C empieza a desarrollarse activamente. Otro cambio fue observado en el estanque 10, en donde no se encontró la presencia de algún grupo en estado de crecimiento activo, presentando el mismo comportamiento que en el primer muestreo, como ya se menciono anteriormente.

El análisis por FISH para el tejido de Branquia se muestra en la figura 5. La figura 5A muestra los resultados para el primer muestreo, con las condiciones de talla y temperatura anteriormente mencionadas. El análisis de resultados muestra un crecimiento activo mayor en branquia que en hepatopáncreas en el primer muestreo (Fig. 4A), específicamente en los estanque 6 y 10, en donde se presentaron los grupos Gram (+) Altas en G+C y Bajas en G+C, así como las *Proteobacterias* $\gamma$, alcanzando una participación de entre 60 y 80%, siendo el grupo de las *Proteobacterias* $\gamma$ el mas dominante en ambos estanques. En el estanque 7, también se observó mayor presencia de grupos bacterianos, tales como Gram (+) Altas en G+C, las *Proteobacterias* $\gamma$, $\delta$ y $\acute{a}$, a diferencia de hepatopáncreas, donde solo se encontraba el grupo Gram (+) Altas en G+C. En el estanque 8 se observaron cuatro grupos activos que fueron: las Gram (+) Bajas en G+C y Altas en G+C; las *Proteobacterias* $\gamma$ y $\delta$, siendo el grupo dominante las *Proteobacterias* $\gamma$, con una participación del 50 % y los grupos de las Gram (+) Altas en G+C y Bajas en G+C, así como las *Proteobacterias* $\delta$ participando cada uno con un 25 %. En el estanque 9, se observó un aumento en la participación de

cada grupo en comparación con hepatopáncreas del primer muestreo; estando presentes los cinco grupos bacterianos (Gram (+) Altas en G+C y Bajas en G+C, y el grupo de las *Proteobacterias* $\gamma$, $\delta$ y $\acute{a}$) con una participación de aproximadamente 50 % cada uno.

En la figura 5B (segundo muestreo), se muestra en los estanques 6, 8 y 10 un pequeño aumento en la participación total de los grupos en comparación con el primer muestreo (Fig 5A). En el estanque 6, se observó la presencia de los grupos *Proteobacterias* $\delta$ y $\acute{a}$, los cuales no habían sido observados en el primer muestreo. Para el estanque 7 disminuyó el numero de grupos presentes, así como su participación, encontrándose solo los grupos Gram (+) Bajas en G+C y Altas en G+C. En el estanque 8, un aumento en la participación de cada grupo fue observado, así como la presencia del grupo *Proteobacterias* $\acute{a}$. En el estanque 9, se observó una disminución en la participación total de los 5 grupos, solo que en la participación individual los grupos Gram (+) Bajas en G+C y las *Proteobacterias* $\delta$ aumentaron en su participación, dominado el ambiente. En el estanque 10 también se observó un aumento en el número de grupos y en la participación de cada uno.

Los resultados muestran que en branquia del segundo muestreo (Fig. 5B), hay un crecimiento activo menor que en hepatopáncreas en el segundo muestreo (Fig. 4B), alcanzando en hepatopáncreas del segundo muestreo una participación entre 350-500 % en los estanques 7, 8, 9, y 10 que son los mas representativos. A

diferencia de branquia en el segundo muestreo, que presento una participación entre 100-200 % en los estanques 6, 8, 9 y 10.

La figura 5C, muestra los resultados para el tercer muestreo, donde se observó un comportamiento parecido al primer muestreo (Fig. 5A). En el estanque 6 la flora bacteriana inicial es mantenida con los grupos Gram (+) Bajas en G+C y Altas en G+C; y *Proteobacterias* $\gamma$, teniendo la misma participación cada uno. En el estanque 7 se presentó el reestablecimiento de la flora bacteriana inicial, observándose el mismo comportamiento en el estanque 9, en donde se habían mantenido los mismos grupos desde el primer muestreo, solo que con variaciones en su participación. En el estanque 8, los grupos Gram (+) Bajas en G+C y las *Proteobacterias* $\alpha$ no se observan metabolicamente activos, los grupos Gram (+) Altas en G+C, *Proteobacterias* $\gamma$ y $\delta$, siguen estando presentes. Los grupos bacterianos Gram (+) Altas en G+C y *Proteobacterias* $\gamma$ fueron numéricamente los mas dominantes en branquia a través de los 3 muestreos realizados, debido a su presencia en los 5 estanques.

El análisis por FISH para el tejido de intestino (Fig.6), muestra en la figura 6A los resultados para el primer muestreo, en las condiciones ya mencionadas anteriormente. La flora bacteriana metabolicamente activa encontrada en los estanques 6 y 9, estaba formada por los grupos bacterianos Gram (+) Altas en G+C y las *Proteobacterias* $\gamma$ y $\alpha$. En el estanque 7, además de estos tres grupos se observó la participación del grupo Gram (+) Bajas en G+C. En el estanque 8 se

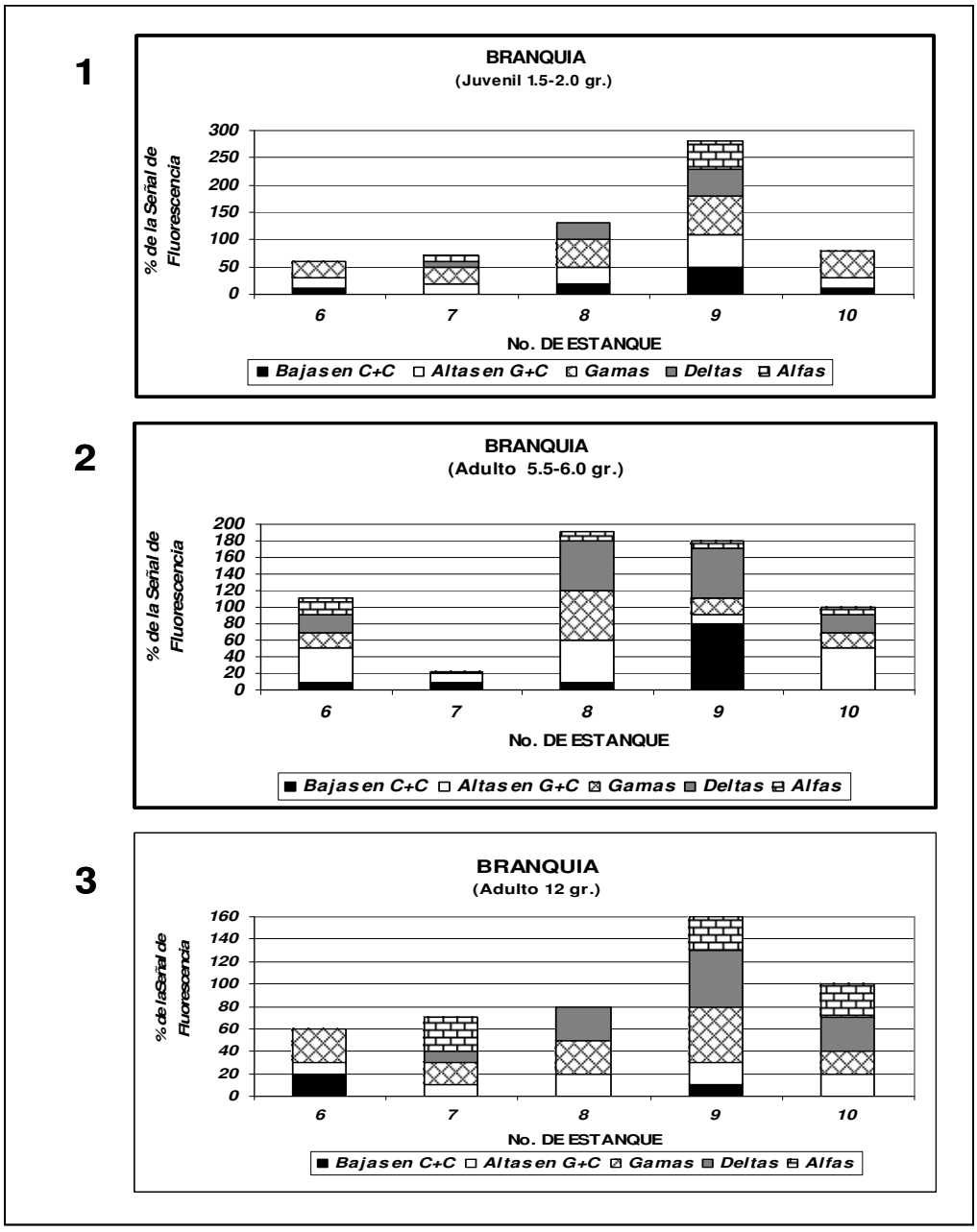


Figura 5. Análisis bacteriano por FISH de las muestras de Branquia, en los tres muestreos realizados durante el desarrollo del cultivo de camarón. El análisis muestra las etapas de crecimiento del camarón y la talla: 1) Juvenil (1.6-2.0 gr.), 2) Adulto (5.5-6.0 gr.), Adulto (> 12 gr.). Los 5 estanques analizados, los 5 grupos bacterianos analizados con los oligonucleótidos Altas en G+C, Bajas en G+C, *Proteobacterias* $\gamma$ (gamas), δ (deltas) y $\acute{\alpha}$ (alfas) y la participación de cada grupo en porcentaje de señal.

observaron los grupos Gram (+) Altas en G+C y *Proteobacterias* $\gamma$, con una participación del 25 % cada uno. El mismo comportamiento se obtuvo con hepatopáncreas en el estanque 8 del primer muestreo (Fig. 4A). En el estanque 10, se encontraron los grupos bacterianos Gram (+) Altas en G+C y las *Proteobacterias* $\gamma$ *y ά*. Las observaciones en los 5 estanques mostraron una microbiota metabolicamente activa dominada por los grupos *Proteobacterias* $\gamma$ y las Gram (+) Altas en G+C, por encontrarse numéricamente mas representados.

En la figura 6B (segundo muestreo), en general se observó un crecimiento activo de todos los grupos en los 5 estanques, alcanzando participaciones totales de 400-500 %. En los estanques 6 y 7 se observó el mismo comportamiento, donde se encontraron presentes los cinco grupos analizados, con el mismo porcentaje de señal de fluorescencia. En los estanques 9 y 10 también se encontraron los cinco grupos, solo que con porcentajes de señal un poco mas bajas. En el estanque 7, el grupo de las *Proteobacterias γ* nos se observó metabolicamente activo, sin embargo los otros cuatro grupos mostraron una participación del 100 % cada uno.

Para el tercer muestreo se observó una disminución en los porcentajes de señal, así como la presencia de grupos bacterianos (Figura 6C). Los grupos Gram (+) Altas en G+C y las *Proteobacterias γ*, continuaron presentes en casi todas las muestras, pero con un porcentaje de señal más bajo que los grupos de las *Proteobacterias δ* y *ά,* aunque estos últimos no estaban representados en todas las muestras.

En comparaciones realizadas con los otros tejidos, se observó un comportamiento parecido en hepatopáncreas, donde se detecta una flora bacteriana similar en el primer muestreo, la cual se aumentó en el segundo muestreo cuando la temperatura incremento de 25℃ a 32℃. Lo cual se manifestó por un aumento en el número de grupos detectados y por su participación en porcentajes de señal más altos. En el tercer muestreo, la temperatura aumentó a 36℃, sin embargo la flora bacteriana disminuyó, alcanzando porcentajes similares a los del tercer muestreo. Siendo branquia la excepción, ya que se observó un comportamiento estable en la microbiota presente durante los tres muestreos realizados.

En general, en el primer muestreo se observó que branquia fue el tejido más colonizado seguido de intestino y hepatopáncreas, relación que cambio para el segundo y tercer muestreo, donde intestino y hepatopáncreas fueron los más colonizados. Una explicación posible a esto puede ser, que la vía de entrada de los microorganismos a los tejidos empieza a través de la branquia en forma no invasiva, sino por contacto con el agua y alimento, explicación por la cual branquia es mayormente colonizada al inicio del cultivo, pasando a intestino y finalmente a órganos internos como hepatopáncreas.

Según la explicación de algunos autores las bacterias no son comúnmente encontradas en hepatopáncreas, ya que son excluidas por el tamizado gástrico, el cual excluye partículas de mas de 0.1 mm (Hopkin and Nott, 1980). También ha sido sugerido que el tamizado gástrico puede ser combinado

con acción de las enzimas digestivas para prevenir la entrada y colonización de bacterias al hepatopáncreas. En el estudio realizado por Gómez-Gil *et al.*, (1998) sugiere que la presencia de bacterias en hepatopáncreas no necesariamente son indicativas de enfermedad, en este caso ellos encontraron un gran numero de *Vibrio spp*. en hepatopáncreas de camarones saludables. En otros casos de camarones enfermos, que presentan altas mortalidades son una o dos especies de *Vibrios* las que predominan (de la Peña *et al*., 1993; Yang *et al*., 1992), como el caso en *P. monodon* en Taiwan (Chen *et al*., 1992), donde la mayoría de los aislados fueron dos especies *V. damsela* y *V, harveyi.*

Aunque se han realizado diferentes estudios de bacteria asociadas con enfermedades en camarón (Lightner, 1993), han sido relativamente pocos reportes que describan la flora bacteriana normal en camarón cultivado con buen estado de salud. En peces y otras especies acuáticas, la flora bacteriana encontrada ha sido relacionada con el ambiente en el cual estos viven (Scott y Thune, 1986; Karthiayani y Iyer, 1975) y razonablemente se asume que esta relación existe en camarón.

También se observó la presencia de cianobacterias filamentosas en hepatopáncreas del estanque 6, en donde no se observó la presencia de otros grupos bacterianos (Fig. 4A y 4B). Las cianobacterias también se observaron en Intestino de los estanques 9 y 10 en el tercer muestreo, donde se observó gran cantidad de bacterias y cianobacterias coexistiendo (Fig. 6C). Por lo que, es muy

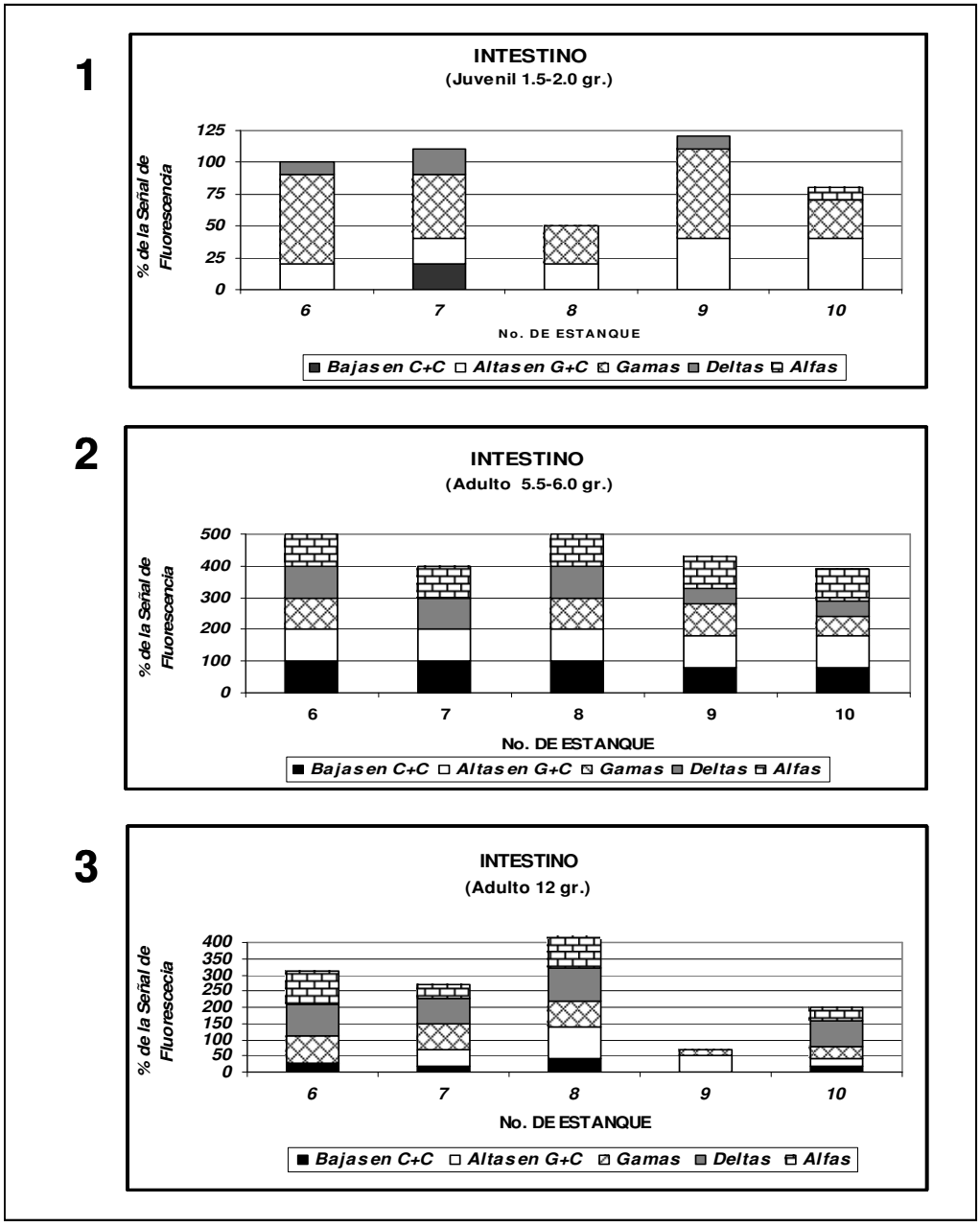


Figura 6. Análisis bacteriano por FISH de las muestras de Intestino, en los tres muestreos realizados durante el desarrollo del cultivo de camarón. El análisis muestra las etapas de crecimiento del camarón y la talla: 1) Juvenil (1.6-2.0 gr.), 2) Adulto (5.5-6.0 gr.), Adulto (> 12 gr.). Los 5 estanques analizados, los 5 grupos bacterianos analizados con los oligonucleótidos Altas en G+C, Bajas en G+C, *Proteobacterias γ* (gamas), *δ* (deltas) y *ά* (Alfas) y la participación de cada grupo en porcentaje de señal.

probable que se trate de diferentes especies de cianobacterias, debido a que no presentan el mismo comportamiento “social”. También puede ser que la misma especie de cianobacteria se encontrara en diferentes etapas de crecimiento o que esta especie solo produzca los antimicrobianos en hepatopáncreas.

En los microorganismos, la producción y liberación de metabolitos secundarios (enzimas, toxinas, antibióticos), se da al inicio de la fase estacionaria (Bassler *et al*, 1997; Arce,. 2002), como una estrategia por mantener el nicho ecológico. Pudiendo ser que en hepatopáncreas del estanque 6, las cianobacterias observadas se encontraran en esta etapa de liberación de metabolitos y que a su vez estos hayan estado inhibiendo el crecimiento de las bacterias presentes por liberación de antimicrobianos. Lo cual al parecer no sucedió en los estanques 9 y 10.

La figura 7, muestra la presencia de posibles cianobacterias dominantes en hepatopáncreas del estanque 6. Además muestra que en el análisis por FISH del hepatopáncreas del primer muestreo utilizando el grupo de las *Proteobacterias γ,* no se detectó señal de fluorescencia; al igual que en la figura 7B en donde se muestra el análisis por FISH del segundo muestreo. Con el grupo Gram (+) Altas en G+C, donde tampoco se detectó señal de fluorescencia. Sin embargo, si se observó la presencia de cianobacterias filamentosas. En el tercer muestreo, la figura 7C presentó en el análisis por FISH de intestino, con el grupo Gram (+) Altas en G+C, la presencia de bacterias con señal positiva alrededor de las cianobacterias.

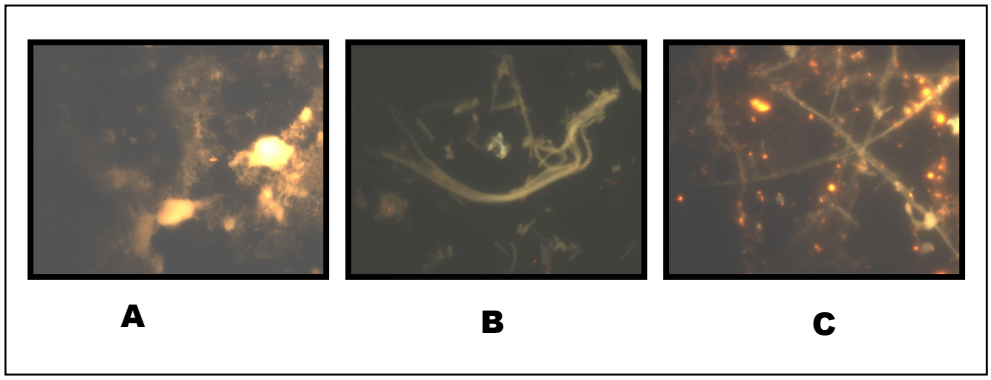


Figura 7. Análisis bacteriano por FISH de tejidos de camarón, que muestra la presencia de posibles cianobacterias dominantes: A) hepatopáncreas del estanque 6 con la sonda de grupo *Proteobacterias γ,* en el primer muestreo, B) hepatopáncreas del estanque 6 con la sonda de grupo Gram (+) Altas en G+C, para el segundo muestreo, C) hepatopáncreas del estanque 6 con la sonda de grupo Gram (+) Altas en G+C, para el tercer muestreo

En los tejidos analizados por FISH, se observaron dos estructuras morfológicas principales: cocos y bacillos de color rojo-anaranjado. (Figura 8 y 9). Encontrándose cocos extra e intracelulares de diferentes tamaños, agrupados o dispersos, con intensidades de señal iguales o más intensas en comparación con los controles. Lo que sugiere que la microflora de camarón esta formada por una gran diversidad bacteriana, con un estado metabólicoactivo para ciertos grupos, que son los dominantes en cierto momento que las condiciones ambientales son

favorables para su desarrollo, inhibiendo a otros grupos bacterianos o dejando que se desarrollen otros grupos cuando a estos grupos no les favorece el medio, lo que posiblemente mantiene un cierto equilibrio en la comunidad bacteriana.

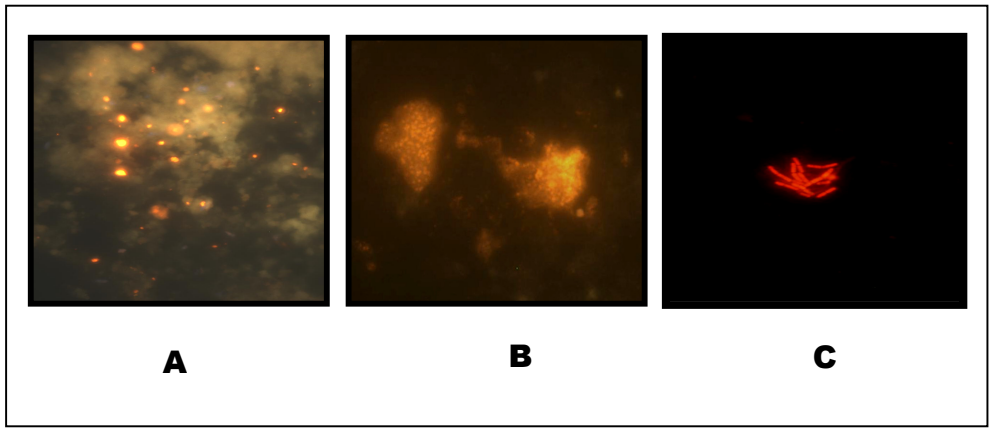


Figura 8. Análisis bacteriano por FISH de tejidos de camarón, donde se muestran diferentes tipos de morfologías y distribución bacteriana: A) hepatopáncreas del estanque 6 con la sonda del grupo de las *Proteobacterias γ*, en el primer muestreo, B) hepatopáncreas del estanque 8 con la sonda del grupo de las *Proteobacterias ά*, para el primer muestreo, C) Branquia del estanque 10 con la sonda del grupo Gram (+) Bajas en G+C, primer muestreo.

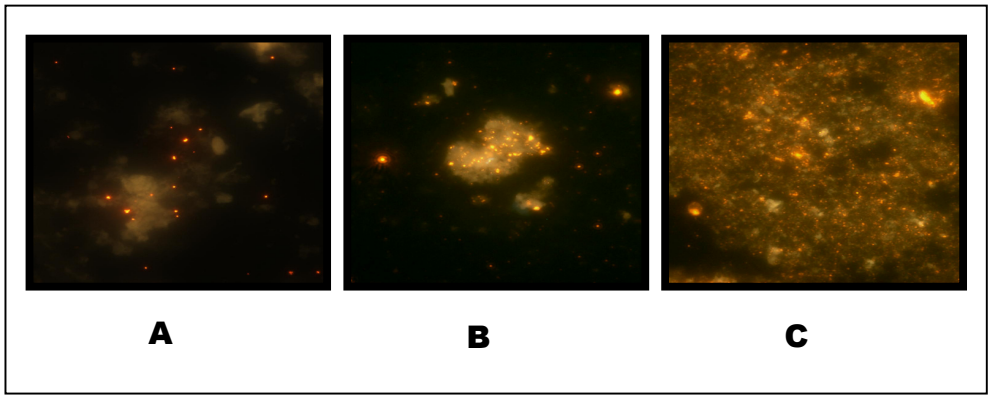

Figura 9. Análisis bacteriano por FISH de tejidos de camarón, que muestran la diversidad bacteriana en hepatopáncreas, branquia e intestino: A) hepatopáncreas del estanque 9 con la sonda del grupo de las *Proteobacterias* $\gamma$, en el primer muestreo, B) Branquia del estanque 8 con la sonda del grupo Gram (+) Altas en G+C, para el segundo muestreo, C) Intestino del estanque 8 con la sonda del grupo Gram (+) Altas en G+C, para el segundo muestreo.

### *II. Análisis por PCR*

En este análisis se probaron varios métodos de extracción de DNA basados en el método tradicional con fenol/cloroformo y un método rápido con Gene Releaser, con el objetivo de encontrar el método más apropiado para la obtención de DNA bacteriano a partir de tejidos de camarón. El método de extracción de DNA con el que se obtuvo una mayor calidad y cantidad de DNA, así como amplificaciones de mayor calidad, fue el método tradicional con ligeras modificaciones. En la extracción de DNA de cultivos bacterianos, también se utilizó el método tradicional para extracción de DNA.

Se realizó el PCR, con el objetivo de comprobar la diversidad bacteriana identificada por FISH y además comprobar la hipótesis de que se pueden amplificar por PCR grupos bacterianos no identificados por FISH, que son grupos bacterianos que aunque no están en crecimiento activo, si se encuentran presentes formando parte de la comunidad bacteriana, esperando que las condiciones medio-ambientales sean las adecuadas para su desarrollo (Fig. 10).

Se utilizaron los oligonucleótidos grupo específico para; *Pseudomonas*, *Proteobacterias* β y el género *Bacillus*, los cuales no fueron utilizados por FISH. Además de amplificar los grupos Gram (+) Altas en G+C y

Bajas en G+C, así como los grupos de las *Proteobacterias γ* γ*, δ* y *ά*, que fueron identificados por FISH, como grupos metabolicamente activos o en rápido crecimiento.

Se realizaron amplificaciones con los tres tejidos obtenidos de los 5 estanques en estudio para el primer muestreo, obteniéndose el mismo patrón de bandas en las amplificaciones. Dado que se amplificaban todos lo grupos en estudio se decidió continuar analizando los tres tejidos, pero solo de los estanques 6 y 8. Estos estanques fueron considerados debido a que en el segundo muestreo, el estanque 6 era el que presentaba menor desarrollo bacteriano y el estanque 8 presentaba un mayor desarrollo de todos los grupos.

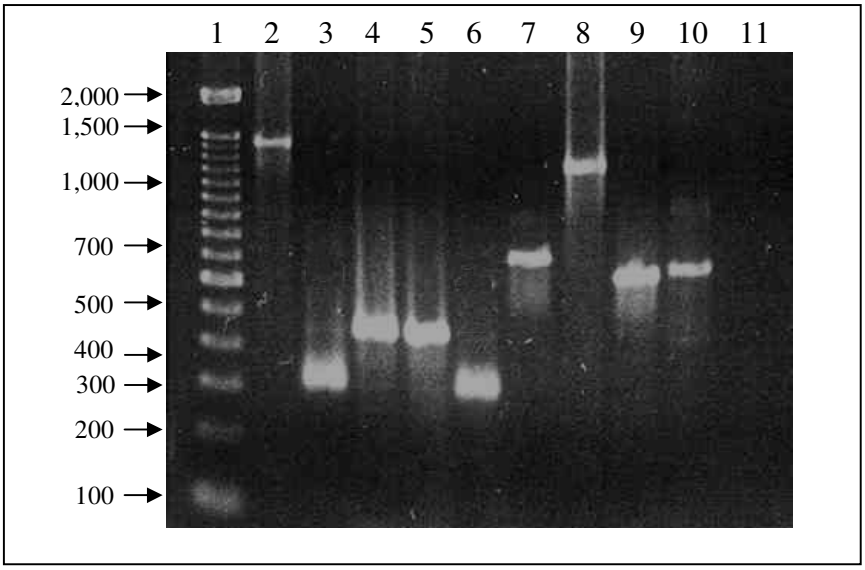


Figura 10. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5 %, que muestra la amplificación del 16S rDNA con oligonucleótidos de grupo para

hepatopáncreas del estanque 6, del segundo muestreo: 1) Marcador de peso molecular, 2) *Proteobacterias γ*, 1450 pb. 3) *Proteobacterias δ*, 230 pb. 4) *Proteobacterias ά*, 500 pb 5) Pseudomonas, 500 pb. 6) Citophagas/flavobacterias, 300 pb. 7) *Proteobacterias β*, 750 pb. 8) Gram (+) Bajas en G+C, 1200 pb. 9) Bacillus, 600 pb. 10) Gram (+) Altas en G+C, 700 pb.y 11) Control negativo.

En el segundo y tercer muestreo se obtuvo el mismo patrón de bandas o la presencia de los 8 grupos analizados y las especies del genero *Bacillus.* La figura 10 muestra los productos obtenidos con el tejido de hepatopáncreas del estanque 6, en el segundo muestreo. Los tamaños de producto obtenidos para cada grupo fueron los esperados, según trabajos previos realizados en el laboratorio de microbiología molecular de CICESE (Hernández., 2000).

La amplificación por PCR del 16S rDNA combinada con clonación y secuenciación, es una de las metodologías ampliamente utilizadas para identificar bacterias en muestras ambientales. Sin embargo, aunque el PCR ofrece una estrategia rápida para obtener información acerca de la composición de la comunidad microbiana, no aporta datos de la estructura y distribución de las bacterias en el ambiente, desconociéndose también su estado metabólico. Por lo que la combinación con la técnica de FISH amplían el conocimiento de la composición y estado metabólico de las bacterias (Hernández, 2000; Olmos, 2003).

De los grupos identificados por FISH y PCR en el presente trabajo, los más reportados en organismos marinos sanos o enfermos son los que pertenecen al grupo de las *Proteobacterias γ*, donde se encuentran clasificadas las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* (Inglis *et al*, 2001)

En camarón, se han identificado algunos patógenos utilizando herramientas moleculares (Nunan *et al*., 2002). Loy y colaboradores (1996), utilizaron la técnica se ISH, para identificar el agente etiológico de la enfermedad hepatopancreatitis necronizante en *Penaeus vannamei* cultivado.

Sin embargo, son pocos los estudios que se dirigen a identificar la diversidad bacteriana y sus cambios con respecto a las alteraciones del cultivo en camarón, utilizando ambas herramientas (FISH/PCR). Existe un trabajo previo en ostión (Hernández 2000), donde reportan bacterias Gram positivas Bajas en G+C y *Proteobacterias γ* en branquia de ostión, como grupos dominantes (metabólicamente activos) utilizando FISH. En este trabajo, también se reportaron los grupos metabólicamente inactivos como las bacterias Gram (+) Altas en G+C, *Proteobacterias* β y ά, especies de *Pseudomonas* que fluorescen y del género *Bacillus,* por medio de PCR (Hernández, 2000).

### *III. Aislamiento y purificación de cianobacterias*

Al realizar el análisis de la diversidad bacteriana por FISH, se observó la presencia de cianobacterias filamentosas en hepatopáncreas e intestino de camarón como ya se mencionó anteriormente.

Las cianobacterias tienen la capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios tales como hormonas, vitaminas y antibióticos, entre otros (Whitton y Malcolm, 2000). Surgiendo la idea de que posiblemente las cianobacterias estuvieran dominando el nicho ecológico por la liberación de antimicrobianos.

En observaciones realizadas en el sitio de muestreo, los camarones se alimentaban en un 30% de cianobacterias, estos mostraban una pigmentación verde en su cutícula y tracto digestivo (datos proporcionados por los trabajadores de la granja). Además de no mostrar problemas patológicos en todo el desarrollo del cultivo, lo que sugiere la posibilidad de que las cianobacterias estuvieran realizando una función probiótica en el camarón. Por lo antes mencionado surgió el interés por identificar a este microorganismo.

Así, se aisló una cianobacteria filamentosa de hepatopáncreas de camarón, a partir del estanque 6 del segundo muestreo y se obtuvo un cultivo unicianobacterial. En la figura 11, se muestra la separación de filamentos por fototactismo, en placa de agar y los filamentos de cultivos unicianobacteriales.

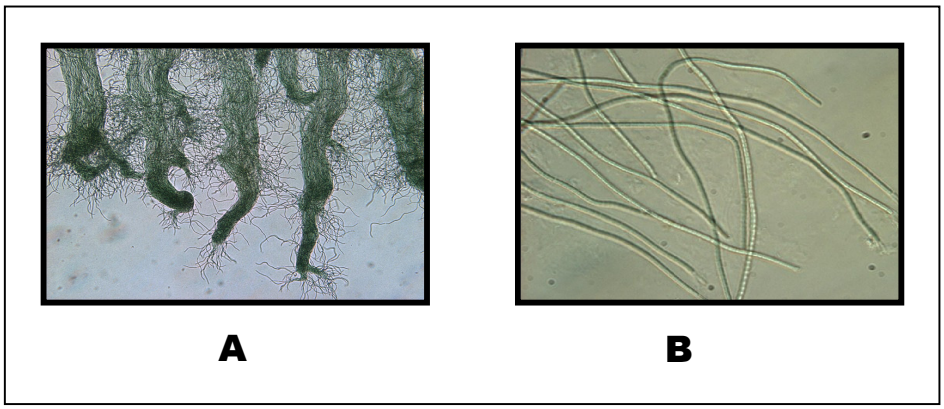

Figura 11. Observación microscópica de cianobacterias filamentosas aisladas de hepatopáncreas de camarón, estanque 6, segundo muestreo: A) Separación de filamentos por fototactismo, microscopía de campo claro utilizando el objetivo 40X, B) Preparación de filamentos aislados, microscopia de campo claro utilizando el objetivo 100 X.

### III.1. Identificación morfológica

La cianobacteria aislada se trató de identificar basándose en su estructura morfológica, utilizando los manuales de clasificación (Rippka, 1988) y con apoyo de la Dra. Elizabeth Ponce (comunicación personal), ya que cuenta con un catálogo de cianobacterias ya identificadas, que fueron aisladas del mismo lugar. Las comparaciones realizadas no mostraron similitud alguna.

### III.2. Identificación molecular

Se obtuvo DNA de cianobacterias del hepatopáncreas del estanque 6, del segundo muestreo y del cultivo puro. Se amplificó el DNA de cada muestra utilizando los oligonucleótidos ARNr 23S y cianol16Sfin (Torres-Ariño, 2001), que amplifican la región intergénica que comprenden la parte final del gene que codifica para el 16S rRNA y la parte inicial del 23S rRNA. Con los cuales se obtuvo una banda de peso molecular entre 500-600 pb (Fig. 12).

Los resultados muestran que el tamaño varía un poco entre el producto obtenido a partir del DNA de cultivo puro y el de tejido, lo cual puede deberse a la

presencia de dos especies diferentes o a que en tejido existen más especies de cianobacterias, dando como resultado dos productos diferentes. Además se amplificó ADN de *E. coli* que fue utilizado como control positivo de la reacción, obteniéndose un producto del peso esperado y dos productos de menos de 400 pb (Fig. 12). Aun y cuando estos oligonucleótidos fueron diseñados específicamente para la región ITS de cianobacterias, se observó que amplifican con DNA de *E. coli*. La variación en tamaño puede deberse a las diferencias entre eubacterias y cianobacterias.

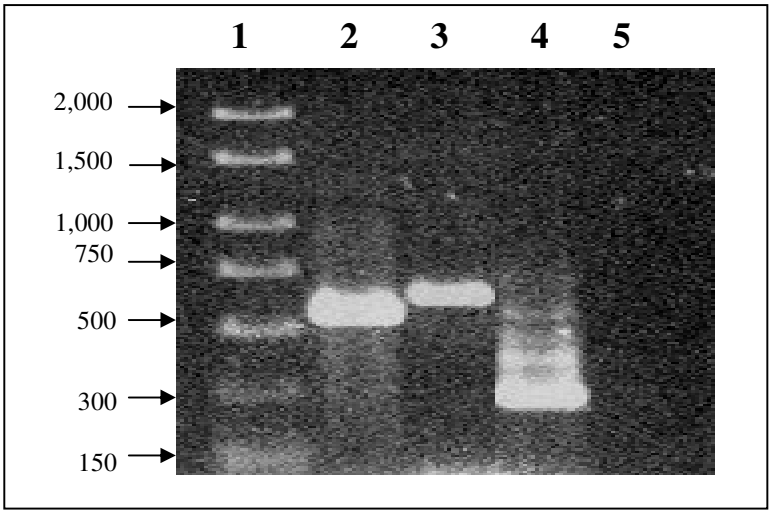


Figura 12. Análisis electroforético de productos de PCR de la región intergénica 16S-23S de cianobacterias, Carril: 1) Marcador de peso molecular, 2) Cianobacteria de cultivo puro, 3) Cianobacteria obtenidas de hepatopáncreas del estanque 6, 4) *E.coli*. y 5) Control (-).

Los productos fueron digeridos con la enzima de restricción *HhaI*, la cual reconoce 4 nucleótidos. En la figura 13 se muestra un gel con los patrones de restricción obtenidos de los productos de PCR de la región ITS (16S-23S). En el carril 1 se muestra el RFLP del producto de PCR de la cianobacteria asilada, con la cual se obtuvieron 3 fragmentos de aproximadamente: 300, 200 y 100 pb, dando una suma de 600 pb, que corresponde al tamaño del producto amplificado sin digerir. El carril 2 muestra el RFLP del producto de PCR de las cianobacterias aisladas del hepatopáncreas, en este caso se obtuvieron 4 fragmentos de aproximadamente 300,200, 150 y 50 pb, dando una sumatoria de 710, la cual no corresponde con el fragmento sin digerir (600 pb). Pudiendo tratarse de una nueva especie no identificada, ó de la mezcla de DNA de otras cianobacterias o bacterias contaminantes que están alterando el patrón.

El patrón de restricción obtenido de la cianobacteria aislada, mostró similitud con el patrón de restricción de la cianobacteria *Phormidium okeni* II reportada por Lagunas (2003). Sin embargo, las características morfológicas no coinciden con este género. Además de presentar patrones de restricción diferentes entre cianobacterias de cultivo y de tejido. Lo cual puede deberse a la existencia de otras especies de cianobacterias en tejido como se mencionó anteriormente. La otra razón es que se haya amplificado DNA de bacterias contaminantes, ya que no es un cultivo axénico.

Por otro lado, obtenida la secuencia del gene 16S rRNA, se realizó un alineamiento con secuencias de este gene para observar el grado de similitud o divergencia, las cuales se editaron en el programa DNAstar, utilizando el programa MegAlign. La cianobacteria aislada, presentó un porcentaje de homología del 99 % con la cianobacteria *Oscillatoria limnetica.*

La discrepancia entre la identificación morfológica y molecular, puede deberse a que una región muy conservada del gene 16S rDNA se haya secuenciado, e impida observar variabilidad intra-especifica.

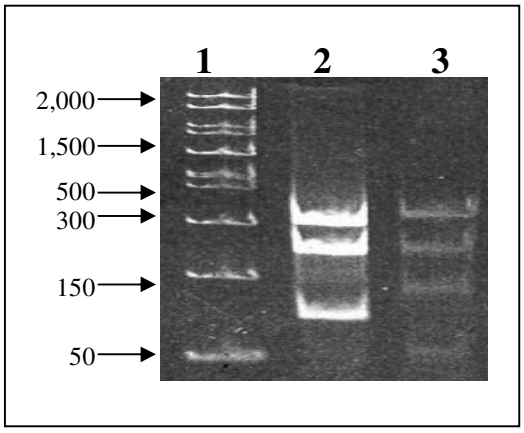


Figura 13. Análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S de cianobacterias, con la enzima *HhaI*. Foto I, carril: 1) Marcador de peso molecular, 2) RFLP de cianobacterias de cultivo puro, 3) RFLP de cianobacterias obtenidas de hepatopáncreas. Esquema II, carril: 4) Marcador de peso molecular, 5) RFLP de cianobacterias de cultivo puro, 6) RFLP de cianobacterias obtenidas de hepatopáncreas

# DISCUSIÓN

Se probaron diferentes sondas, marcadas con tres diferentes fluorocromos: rojo, verde, amarillo. Teniendo mejores resultados con las sondas marcadas con color rojo. Esto puede deberse a la estabilidad del fluorocromo añadido o a que estos grupos no se encontraban metabolicamente activos en las muestras analizadas.

Para conocer la dominancia numérica de las especies o grupos activos metabólicamente, los métodos mas utilizados son la filtración o citometria para realizar conteos por células (Glöckner. *et al*. 1999; Snaidr. *et a*l 1997; Amann *et al*, 1990). En este trabajo la particularidad de las muestras no permitió realizar el conteo bacteriano exacto de esta forma, ya que él numero de bacterias observadas y su distribución: (agrupadas o libres y en su mayoría intracelulares o unidas al tejido), impidió realizar ese tipo de conteo. Lo que dio como consecuencia la implementación de un método semi-cuantitativo para enumerar a las bacterias, el cual arrojó resultados que permitieron observar diferencias significativas en la presencia de los grupos. La enumeración bacteriana es ampliamente utilizada en estudios de diversidad bacteriana en diferentes tipos de muestras ambientales, agua de mar, lodos activados y biopelículas (Amann *et a*l, 1995).

Una forma precisa para realizar conteos bacterianos en tejidos cuando existe gran cantidad de bacterias sería realizar microscopía electrónica de barrido

con cortes histológicos y PCR tiempo real (Olmos, 2003). Como en el trabajo realizado por Webster y colaboradores (2001) con la esponja *Rhopaloeides adoribile*, donde realizaron FISH de cortes de 10 µm de longitud, para localizar la distribución de las bacterias en la estructura de la esponja. Identificando una gran diversidad de grupos: *Actinobacterias*, bacterias gram positivas Bajas en G+C, β y γ subdivisiones de las *Proteobacterias, Cytophaga/Flavobacterium*, bacterias verdes sulfurosas, bacterias verdes no sulfurosas, *Planctomycetes*, encontrándose en su mayoría en relación simbiótica.

Una de las limitaciones reportadas para la técnica de FISH es la autofluorescencia de algunos microorganismos como levaduras, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Rhodospirillum centenum* y cianobacterias, así como restos de material orgánico e inorgánico con fluorescencia natural (Moter *et al*, 2000). En el presente trabajo no se encontró señal de autofluorescencia con los controles realizados, por lo que podemos decir que se eliminó la posibilidad de obtener resultados falsos-positivos. (Poner un trabajo de autofluorescencia)

En los resultados obtenidos por FISH, se observó la presencia de cianobacterias en el hepatopáncreas del estanque 6 en el primer y segundo muestreo, con la nula o escasa presencia de bacterias creciendo a su alrededor, (Fig. 5A y 5B). Relación no observada en los estanques 9 y 10 en el primer muestreo, donde se observó gran cantidad de bacterias y cianobacterias coexistiendo (Fig. 5C). Es muy probable que se trate de otra especie de cianobacterias, debido a que no presenta la misma actividad o se encuentra en

otra etapa de crecimiento, además de encontrarse en otro tejido. Lo cual puede deberse a dos fenómenos principalmente: 1) hepatopáncreas es un órgano interno, que además, produce una gran cantidad de enzimas; estas características lo hacen ser de difícil acceso para los microorganismos. 2) la eliminación de bacterias por liberación de antimicrobianos, en caso que la cianobacteria se encuentre al inicio de la fase estacionaria, que es donde se realiza la producción de metabolitos secundarios (enzimas toxinas, antibióticos) (Bassler *et al*, 1997; Arce,. 2002), pudiendo ser normal el no encontrar la presencia de bacterias en ese tejido.

En general se observó en el primer muestreo que hepatopáncreas es el tejido menos colonizado seguido de intestino y branquia. Relación que cambio para el segundo y tercer muestreo, donde intestino y hepatopáncreas fueron los más colonizados y branquia el menor. Una explicación a esto puede ser, que la vía de entrada de los microorganismos a los tejidos empieza a través de la branquia en forma no invasiva, sino por contacto con el agua y alimento, explicación por la cual branquia es mayormente colonizada al inicio del cultivo, pasando a intestino y finalmente a órganos internos como hepatopáncreas.

En el segundo muestreo se observó un aumento en el número de grupos presentes, así como en el porcentaje de señal, esto debido quizás a los cambios en los parámetros y calidad del agua ( ). La variable que cambió drásticamente fue la temperatura de 25ºC a 32ºC, lo cual posiblemente ocasionó un aumentó en los grupos.

El siguiente mes la temperatura aumentó a 35ºC, con una diferencia de 3ºC entre el segundo y tercer muestreo, y de 10ºC desde el inicio del cultivo. Además, se presentó un cambio en la calidad de agua lo que originó un recambio del 100%. A pesar que la temperatura seguía aumentando, el número de bacterias disminuyó (Grafica 3), debido quizás a la calidad de agua que se vio favorecida por el recambio.

Una buena calidad de agua es necesaria para evitar el crecimiento bacteriano y la intoxicación debido a un aumento en la materia orgánica disuelta (amonio, sulfato, azufre, nitrógeno), lo que llevaría al animal a estar en estado de estrés y lo haría más susceptible a contraer una infección o enfermedad.

En este estudio se observaron principalmente los grupos Altas en G+C y *Proteobacterias* $\gamma$. Sin embargo, en el tercer muestreo se vio que además de estos grupos se encontraban las *Proteobacterias* ά y δ. En el grupo de las *Proteobacterias* δ se encuentran las especies *Desulfovibrios*, bacterias que se encargan de llevar a cabo los procesos de desulfuración, proceso que debe estar aumentando conforme madura el cultivo, dado que en el cultivo se encuentra una concentración elevada de materia orgánica disuelta.

En el análisis bacteriano por PCR se observó que los grupos identificados por FISH también se detectaron por PCR (Fig. 10). Además se detectaron otros grupos no identificados por FISH (*Proteobacterias* β, *Pseudomonas* y especies del genero *Bacillus*). Lo que corrobora que no sólo los grupos activos metabólicamente son los que están presentes en un cultivo.

La amplificación por PCR del 16S rDNA combinada con clonación y secuenciación, es una de las metodologías ampliamente utilizadas para identificar bacterias en muestras ambientales. Otras de las secuencias utilizadas para la detección de bacterias son las secuencias ctx que son factores de virulencia producidos por bacterias patógenas del genero *Vibrio*, tales como *V. cholerae* 01. Utilizando esta herramienta para identificar *Vibrio cholerae* en alimentos (Koch *et al*, 1993, Karunasagar *et al*, 1995).

Sin embargo, aunque el PCR ofrece una estrategia rápida para obtener información acerca de la composición de la comunidad microbiana, no aporta datos de la estructura y distribución de las bacterias en el ambiente, desconociéndose también su estado metabólico. Por lo que la combinación con la técnica de FISH amplían grandemente el conocimiento de la composición y estado metabólico de las bacterias (Hernández, 2000; Olmos, 2003).

De los grupos identificados por FISH y PCR en el presente trabajo, los más reportados en organismos marinos sanos o enfermos son los que pertenecen al grupo de las *Proteobacterias* $\gamma$, donde se encuentran clasificadas las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. Algunas de las especies patógenas en microorganismos marinos cultivados son: *Salmonella*, *Shigella* y algunas especies del género *Vibrio,* también encontrados en agua y sedimento (Inglis *et al*, 2001)

En camarón se han identificado algunos patógenos utilizando herramientas moleculares (Nunan *et al*., 2002), para lo cual se diseñaron primers para la región 16S rRNA, utilizando estos fragmentos como sondas para hibridizaciones *in situ*

(ISH), marcadas con dioxigenina. Esta metodología fue en su inicio utilizada por Loy y colaboradores (1996), para identificar el agente etiológico de la enfermedad hepatopancreatitis necronizante en *Penaeus vannamei* cultivado. Sólo que aquí se utilizó la hibridación in situ con oligos fluorescentes, para detectar las bacterias en camarones infectados por *Rickettsias*, previamente identificadas por PCR, clonación y secuenciación.

Sin embargo, son pocos los estudios que se dirigen a identificar la diversidad bacteriana y sus cambios con el ambiente en camarón, utilizando ambas herramientas (FISH/PCR). Existe un trabajo previo en ostión (Hernández 2000), donde reportan bacterias gram positivas Bajas en G+C y *Proteobacterias* $\gamma$ en branquia de ostión, como grupos dominantes (metabólicamente activos) por FISH. En este trabajo también se reportaron los grupos metabólicamente inactivos como las bacterias gram positivas Altas en G+C, *Proteobacterias* β y ά, especies de *Pseudomonas* que fluorescen y del género *Bacillus,* por medio de PCR (Hernández, 2000).

Un producto de 500-600 pb fue obtenido de cianobacterias a partir de cultivo puro y de tejido, un ligero aumento en el tamaño fue observado en el producto obtenido de tejido, lo cual puede deberse a que se trata de dos especies diferentes o a que en tejido existen más especies de cianobacterias. Aun y cuando estos oligonucleótidos fueron diseñados específicamente para la región ITS de cianobacterias, se observó que amplifican un producto de menor peso con DNA

de *E. coli*. La variación en tamaño puede deberse a las diferencias entre eubacterias y cianobacterias.

El patrón de restricción de los ITS obtenidos en este trabajo, mostró similitud con *Phormidium okeni* II (Lagunas, 2003). Sin embargo, las características morfológicas no coinciden con este género. Además, de presentar patrones de restricción diferentes entre cianobacterias de cultivo y de tejido. Lo cual puede deberse a la existencia de otras especies de cianobacterias en tejido. La otra razón es que se haya amplificado DNA de bacterias, ya que no es un cultivo axénico.

El análisis de las secuencias del gene 16S rDNA muestra una homología del 99 % con *Oscillatoria limnetica*, aunque sus características morfológicas no coinciden con los reportados para esta especie. La diferencia en la morfología de la cianobacteria aislada y la reportada para ese género puede deberse, al tipo de medio de cultivo que se utilice, ya que esta reportado que esto influencia en su tipo de crecimiento y morfología. Las cianobacterias marinas, principalmente requieren de vitamina $B_{12}$ para su crecimiento (Rippka, 1988), siendo el medio mas utilizado para su cultivo el ASN III, que contiene 2.1 gr/lt de vitamina $B_{12}$ (Rippka, 1988). En este trabajo se utilizó medio f1/2 con una concentración a la mitad de vitamina $B_{12}$ (1 gr/lt), pudiendo deberse a esta deficiencia en vitamina B que la cianobacteria aislada presentara un crecimiento diferente a la de esta especie.

La discrepancia entre la identificación morfológica y molecular, puede deberse también a que una región muy conservada del gene 16S rDNA se haya secuenciado, e impida observar variabilidad intra-especifica.

# CONCLUSIONES

Se demostró que en *Litopenaeus vannamei* una gran diversidad bacteriana se encuentra presente coexistiendo y cambiando su estado de crecimiento, según sean favorables o no las condiciones ambientales. Lo que había sido subestimado por los métodos de identificación tradicionales.

Se encontró que la diversidad bacteriana presente en los tejidos de camarón *L. vannamei*, estuvo dominada en los tres muestreos por dos grupos principales: altas en G+C y *Proteobacterias* $\gamma$, $s$eguido por el grupo de las *Proteobacterias* $\delta$.

El tejido que presentó un mayor dinamismo en la composición de su microbiota fue el Intestino, seguido de Branquias y finalmente el menos colonizado fue Hepatopáncreas.

Los estanques que tuvieron mayor presencia de grupos bacterianos fueron los estanques 8, 9 y 10.

También se demostró que el aumento en la temperatura y la calidad del agua son factores importantes, que interfiere de gran manera en el desarrollo

bacteriano. Por lo que se concluye que en el segundo muestreo es cuando hay una mayor presencia de bacterias.

También se demostró la aplicabilidad de la técnica de FISH para identificar bacterias metabólicamente activas, cultivables y no cultivables, así como la aplicación de PCR para identificar diversidad bacteriana total, en cultivos semi-intensivos de camarón *Litopenaeus vannamei*.

En general podemos decir que las técnicas de FISH y PCR son herramientas moleculares con gran aplicabilidad en el conocimiento de la diversidad microbiana en cultivo de camarón siendo estas confiables, rápidas y precisas para ser utilizadas como métodos de diagnostico en la camaronicultura.

# PERSPECTIVAS

Siendo un trabajo que aporta información muy amplia y general, en cuanto a la composición de la microbiota presente en ecosistemas abiertos, las perspectivas son diversas. Lo primero que se propone es la identificación a nivel de especies de los grupos más importantes que se identificaron y que tengan antecedentes como patógenos o probióticos.

Para lo que se propone la construcción de bibliotecas genómicas y el diseño de sondas especificas, con lo que se podría obtener información mas precisa de la diversidad bacteriana presente en muestras de camarón.

También se pueden realizar estudios para conocer cómo cambia la diversidad bacteriana, al ser influenciada por las condiciones del medio en condiciones de laboratorio. Todos estos conocimientos permitirán la caracterización de la población bacteriana *in situ* en los cultivos de camarón, tanto a nivel de composición poblacional como al de los cambios bioquímicos. Lo que llevara a tener un mejor monitoreo y control del desarrollo y la actividad de la poblaciones microbianas que se desarrollen en el estanque de cultivo.

En cuanto a la actividad de la cianobacteria, se propone realizar un escalamiento del cultivo y seguir la curva de crecimiento, para encontrar donde se

liberan los metabolitos secundarios y así mismo buscar el tipo de bioactividad que puedan mostrar.

# REFERENCIAS


**Amann, R., Krumholz, L. y Stahl, D. 1990.** Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. **172**:762-770 p.

**Amman, R., Ludwig, W. y Schleifer, K. 1995**. Phylogenetic identificación and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**:143-169 p.

**Arce, D. 2002**. Determinación de la patogenicidad de *Vibrio harveyi* en *Litopenaues vannamei* e identificación de productos extracelulares. Tesis Maestría. CICESE. Ensenada, Baja California, México. 46 p.

**Austin, B y Austin, D. A. 1993**. Bacterial fish pathogens disease in farm and wild fish. 2nd Ed. Ellis Horwood, Ltd. New York. 384 p.

**Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K. y Gannon, F. 1991**. The 16S/23S Ribosomal Spacer Region as a Target for DNA Probes to Identify Eubacteria. PCR Methods and Applications. **1**:51-56 p.

**Bassler. B. L., Greenberg, P. E. y Stevens, A. M. 1997**. Cross-species induction of luminiscence in the *quorum sensing* bacterium *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology.**179**:4043-4045 p.

**Chen, S. N., Huang, S. L. y Kou, G. H. 1992.** Stidies on the epizootics and pathogenicity of bacterial infections in cultured Giant Tiger prawns, Penaeus monodon in Taiwan. En: Fulks, W., Main, K. L. (Eds.), Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, HI. 195-205 p.

**Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Rosazak. D. R., Hug, S. A. y Palmer, L. M. 1985.** Viable, but non-cultirable Vibrio cholerae and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms. Biotechnology. **3**:817-820 p.

**Connally R., Veal D. y Piper J. 2002**. High resolution detection of fluorescently labeled microorganisms in environmental samples using time-resolved fluorescence microscopy. FEMS Microbiology Ecology. **41**:239-245 p.

**de la Peña, L. D., Tamaki, T., Momoyams, K., Nakai, T. y Muroga, K. 1993.** Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaues japonicus*. Aquaculture. **115**:1-12 p.

**Díaz R. y Wacher R., 2003**. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología. **45**:30-40

**Distel, D. y Cavanaugh, C. 1994**. Independent Phylogenetic Origins of methanotrophic and Chemoautotrophic bacterial Endosymbioses in Marine Bivalves. Journal of Bacteriology. **176**:1932-1938 p.

**Eisen, J., Smith, S. y Cavanaugh, C. 1992**. Phylogenetic Relationships of Chemoautotrophic Bacterial Symbionts of Solemya velum Say (Mollusca: Bivalvia) Determined by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. Journal of Bacteriology. **174**:3416-3421 p.

**Giovannoni, S., DeLong, E., Olsen, G. y Pace, N. 1988.** Phylogenetic group-specific oligodeuxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J. Bacteriol. **170**:720-726 p.

**Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. y Amann, R. 1999**. Bacterioplankton Compositions of Lakes and Oceans: a First Comparison Based on Fluorescence In Situ Hybridization. Applied and Environmental Microbiology. **65**:3721-3726 p.

**Golden, J. W., Carrasco, D. C., Mulligan, E. M., Schneider, J. G. y Haselkorn, R. 1988.** Deletion of a 5S kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst dufferentiation of Anabaena sp. Strain PCC7120. Journal of Bacteriology. **170**:5034-5041 p.

**Gomez, G. B., Tron, M, L., Roque, A., F. Turnbull, J., Inglis V. y Guerra, F. A. 1998.** Speies of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaues vannamei*. Aquaculture. **163**:1-9 p.

**Gray, M., Sankoff, D. y Cedergren, R. 1984**. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. Nuc. Ac. Res. **12**:5837-5852 p.

**Guillard, R. L. y J. H. Ryther. 1962**. Studies of planktonics diatoms. I. Cyclotella nana hustedt and Confervacea (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology. **8**:229-239 p.

**Hernández, Z. G. 2000**. Estandarización de las metodologías de FISH y PCR y su utilización en la identificación filogenética de comunidades bacterianas en ostión

(Crassostrea gigas). Tesis de maestría. CICESE. Ensenada, Baja California. 81 p.

**Hernandez, Z. G. y Olmos, S. J.** Bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by FISH and PCR. Journal of Applied Microbiology. En prensa.

**Hopkin, S .P. y Nott, J. A. 1980.** Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) with special reference to the B cells in the hepatopancreas. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. **60**:891-907 p.

**Inglis, V., Roberts, R. J. y Bromage, W. R. 2001**. Bacterial Diseases of fish. Black Well Science . Editoral Offices. Oxford. 312 p.

**John, H., Birnstiel, M. y Jones, K. 1969.** RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. Nature. **223**:582-587 p.

**Jurtshuk, R., Blick, M., Bresser, J., Fox, G. y Jurtshuk, P. Jr. 1992**. Rapid *in situ* hybridization technique using RNAr 16S segments for detecting and differentiating the closely related Gram-Positive organisms. Applied and Enviromental Microbiology. **58**:2571-2578 p.

**Karthiayani, T. C. y Iyer, K. M. 1975.** The bacterial flora of certain marine fishes and prawns in Cochin waters in relation to their environs. J. Mar. Biol. Assn. India. 17:96-100 p.

**Karunasagar, I., Sugumar, G. y Karunasagar, I. 1995**. Rapid detection of *Vibrio cholerae* contamination of seafood by polymerase Chain reaction. Mol. Mar. Biol. Biotech. **4**:365-368 p.

**Koch, W., Payne, W., Wentz, B. y Cebula, T. 1993**. Rapid Polimerase Chain Reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in Foods. Applied and Environmental Microbiology. **59**:556-560 p.

**Kogure, K. U., Simidu, U., y Taga, N., 1980**. Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. Can. J. Microbiol. **26**:318-323 p.

**Lane, D., Pace, B., Olsen, G. y Sthal, D. 1985.** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. **82**:6955-6959 p.

**Lee, DO'C. y Wickins, J.F. 1992.** Crustacean Farming. Blackwell Scientific Publicacions. 392 p.

**Lightner, D. V. 1993.** Diseases of cultured Penaeid Shrimps. En: McVey, J. P. (Ed.), CRC Handbook of Mariculture, 2nd ed. Boca Raton. 393-486 p.

**Lightner, D.V y Lewis, D.H. 1975**. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp, diseases of crustaceans, Mar. Fish. Rev. **37**:25-28 p.

**Lightner, D.V. 1994.** Patología del camarón. Enfermedades de mayor importancia para la industria camaronícola en las Américas. En: Memorias Seminario Internacional de Camaronicultura en México. Camarón.1994. (Editor: J. Z. Hernández). Ralston Purina Internacional, Mazatlán, México. 1-53 p.

**Loy, J., Dewhirst, F., Weber, W., Frelier, P., Garbar, T., Tasca, S. y Templeton, J. 1996.** Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. Applied and Enviromental Microbiology. **62**:3439-3445 p.

**Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. y Heinz, K. 1992.** Phylogenetic Oligodeoxynucleotide probes for the Major Subclasess of Proteobacteria: Problems y Solutions. System. Appl. Microbiol. **15**:593-600 p.

**Marchesi, J., Sato, T., Weightman, A., Martin, T., Fry, J., Hiom, S. y Wade, W. 1998**. Desing and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. **64**:795-799 p.

**Martínez Córdova, L. R. 1999.** Enfermedades del camarón. En: Cultivo de camarones *Peneidos* Principios y prácticas. AGT editor, S.A. México. 207-260 p.

**Matte, T. O., Quénée, P., Cibik, R., Van O. J., Dessevre, F., Firmesse, O. y Tailliez, P. 2001**. Detection and identification of lactic acid bacteria in milk and industrial starter culture with fluorescently labeled rRNA-targeted peptide nucleic acid probes. EDP Sciences. **81**:237-248 p.

**Meier, H., Amman, R., Ludwig, W. y Schipifer, K. 1999**. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-Positive bacteria with low DNA G+C content. System. Appl. Microbiol. **22**:186-196.

**Money, L.L.; Lightner, D.V. y Bell T. A. 1994**. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* boone (Crustacea: Decapoda). Journal of the World Aquaculture Society. **25**:116-125 p.

**Moter, A. y Göbel, U. B. 2000.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. Journal of Microbiological Methods. **41**:85-112 p.

**Muroga, K. 1975**. Studies on *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum* infection. Hiroshima Univer. **14**:101-205 p.

**Nishimura, M., Kita-Tsukamoto, K. y Kogure, K. 1993**. A new Method to Detect Viable Bacteria in Natural Seawater Using 16S rRNA Oligonucleotide Probe. Journal of Oceanography.**49:**51-56 p.

**Nunan, L. M., Noble, B., LeGroumellec, M. y Lightner, D. V. 2003**. Experimental infection of *Penaeus vannamei* a rickettsia-like bacterium (RLB) originating from *P. Monodon*. Dis Aquat Organ. **54**:43-47 p.

**Olmos, S. J**. 2003. Molecular Characterization and phylogenetic identification of marine microorganisms. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco. 23-Octubre-2003. México. 45-46 p.

**Olsen, G., lane, D., Giovannoni, S. y Pace, N. 1986**. Microbial Ecology and Evolution: A ribosomal RNA Approach. Ann. Rev. Microbiol. **40**:337-65 p.

**Pardue, M. L. y Gall, J. G., 1969.** Moleculat hybridization of radioctive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sc. **6464**:600-604 p.

**Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Degraves, R., Lucas, J. y Gray, J. 1988.** Fluorescence *in situ* hibridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. Genetics. **85**:9138-9142 p.

**Raskin, L., Stromley, J., Rittman, B. y Stahl, D. 1994**. Group-Specific RNAr 16S hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Applied and Enviromental Microbiology. **60**:1232-1240 p.

**Reysenbach, A., Giver, L., Wickham, G. y Pace, N. 1992.** Differential Amplification of rRNA genes by Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology. **58**:3417-3418 p.

**Rippka, R. 1988.** Recognition and identification of cyanobacteria. Methods in Enzymology. **167**:28-50 p.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989**. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. Tomo: **1**. 47-60 p.

**Saruta, K. Hoshina, S. y Machida, K. 1995**. Genetic identificacion of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using single-base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene. Microbiol. Inmonol. **39**:839-844.

**Scott, J. B. y Thune, R. L. 1986**. Bacterial flora of hemolymph from Red Swamp Crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard), from commercial ponds. Aquaculture. **58**:161-165 p.

**Sindermann, C. J. y Lightner, D. 1988**. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. 2 ed. Elsevier Science publisher B. V. Amsterdan, The Netherlands. 413 p.

**Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., y Heinz, K. 1997**. Phylogenetic Analysis and *In Situ* Identification of Bacteria in Activated Sludge. Applied and Environmental Microbiology. **63:**2884-2896 p.

**Theron, J. y Cloete, J. 2000**. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. Crit. Rev. Microbiol. **26**:37-57 p.

**Torres-Ariño, A. 2001.** Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas productoras de compuestos de interés biomédico. Tesis de Maestría. CICESE. México. 94 p.

**Vanderzant, C., Mroz, E. y Nickelson, R., 1970**. Microbial flora of Gulf of Mexico and pond shrimp. J. Food Milk Technol. **33**:346-3362 p.

**Webster, N., Wilson, K., Blackall, L. L. y Hill, R. T. 2001.** Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge Rhopaloeides odorabile. Applied and. Environmental. Microbiology. **67**:434-444 p.

**Whitton, A. B. y Malcolm, P. 2000**. The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Inglatera. 669 p**.**

**Wilmotte, A., Auwera, G. V. y DeWachter, R. 1993**. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermofilic *cyanobacterium chlorogloeopsis* HTF (´*Mastiglocladus laminosus* HTF´) strain PCC7518 and phylogenetic analysis. Elsevier Science Publishers B.V. **317**:96-100 p.

**Yang, J., Wu, y. y Zhu, X. 1992.** Pathogenic biology studies on the black gill and brown spot of shell disease syndrome of penaeid shrimp infected by bacteria. Donghai Mar. Sci. Donghai Haiyang. **10**:27-36 p.

**Yasuda, K. y Kitao, T. 1980**. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture.**19**:229-236 p.

**Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., SchÖnhuber, W., Neef, A., Amann, R., Zeyer, y Josef., 1997**. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hibridization. Arch Microbiol. **168**:185-192 p.

**Zherdemant, M.T. 1991**. Caracterización de una cepa bacteriana de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio in vitro con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiotico. Tesis de grado para la obtención del titulo de Acuicultor, Facultad de Ingenieria Maritima y Ciencias del Mar, Escuela Superior y Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. 80 p.

# ANEXOS

***1.- Gelatinización de portaobjetos***

1.- Preparar baño maría entre 60 y 70 °C, y colocar dentro de el un vaso de vidrio que se utiliza para la tinción gram.

2.- Tener limpios y secos los portaobjetos especiales recubiertos con teflón.

3.- Preparar la solución de gelatinizado con 0.1 gr de gelatina mas 99 ml de agua destilada y filtrada, fundir en el microondas por 1 minuto a potencia del 50 %, adicionar 1 ml de sulfato de cromo y potasio al 1 %.

4.- Agregar esta solución al vaso de vidrio vacío que se encuentra en baño maría. Sumergir los portaobjetos varias veces tomados con pinzas, y colocar recargados sobre gradillas que deben estar sobre papel secante, dejar secando por 3 hr.

5.- Guardar en una celda para portaobjetos protegidos del polvo.

***2.- Fluido de montaje***

Preparar la solución en tubo eppendorf de 1.5 ml color ámbar

| | |
|---|---|
| p-fenilendiamino dihidroclorido | 0.001gr |
| Buffer SET 10x | 0.500 ml |

Mezclar suavemente hasta que se disuelva todo

***3.- Aislamiento y purificación de DNA cromosomal de tejido.***

1.- Disectar y tomar 50 mg de tejido y colocar en un tubo eppendorf de 1.5 ml

2.- Adicionar 567 µl de buffer TE (100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl a pH 7.5).

3.- Homogenizar manualmente con pistilo.

4.- Añadir 10 µl de lisozima y mezclar, incubar a 37 ºC por 15 minutos con mezcla intermitente.

5.- Después de la incubación agregar 10 µl de RNAasa, mezclar e incubar a 37 ºC por 40 minutos, con mezcla intermitente.

6.- Adicionar 50 µl de SDS al 10 %, 10 µl de proteinasa K, mezclar con cuidado invirtiendo el microtubo, incubar 1.30 hr a 55 ºC, con mezcla intermitente.

7.- Adicionar 100 µl de NaCl 5M y mezclar con cuidado invirtiendo el microtubo.

8.- Agregar 80 µl de CTAB/NaCl, mezclar con cuidado invirtiendo el microtubo e incubar a 65 ºC por 1 hora, colocando la tapa de seguridad y mezclar ocasionalmente, invirtiendo el microtubo.

9.-Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos para eliminar material grueso.

10.-Para purificar el DNA, tomar el sobrenadante y agregar un volumen de 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico, agitar con vórtex y centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.

10.- Separar la fase acuosa y transferirla a un microtubo nuevo y extraer con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1),agitar con vórtex y centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos. Repetir 2 veces.

11.- Separar la fase acuosa y extraer con un volumen de cloroformo, agitar con vórtex y centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.

12.- Para precipitar las hebras de DNA. Separar el sobrenadante y agregar 0.6 volúmenes de isopropanol (300 µl), mezclar cuidadosamente e incubar a –20 ºC por 3 hr. o toda la noche.

13.- Recuperar el DNA centrifugando a 14,000 rpm por 10 minutos. Descartar el sobrenadante por decantación y lavar 2 veces con 1 ml de etanol al 70 %, centrifugando a 14,000 rpm por 5 minutos.

14.- Decantar el sobrenadante y secar en el SAVANT por 10 minutos.

15.- Resuspender en 50 µl de agua bidestilada filtrada y estéril o mQ.

### *4.- Preparación de medio f/2*

| NUTRIENTES | F/2 ( g/l ) |
|---|---|
| **Macronutrientes:** | |
| $NaNO_3$ | 0.075 g/l |
| $NaSiO_3$ 9*$H_2O$ | 0.03 g/l |
| K2$HPO_4$*3$H_2O$ | 0.005 g/l |
| **Micronutrientes *** | 1.0 ml |
| **Metales traza** | |
| **Vitaminas **** | 1.0 ml |
| ***Solución stock Micronutrientes** | |
| $CuSO_4$*5$H_2O$ | 0.0098 g/l |
| $ZnSO_4$*7$H_2O$ | 0.022 g/l |
| $CoCl_2$*6$H_2O$ | 0.01g/l |
| $MnCl_2$*4$H_2O$ | 0.18 g/l |
| $Na_2MoO_4$*2$H_2O$ | 0.0063 g/l |
| $Na_2$EDTA | 4.36 g/l |
| $FeCl_3$*6$H_20$ | 3.15 g/l |
| ****Vitaminas** | |
| Vitamina B12 | 1.0 g/l |
| Biotina | 100 mg |
| Tiamina HCl | 200 mg |

***5.-Aislamiento y purificación de DNA cromosomal de cianobacterias.***

1.- De los cultivos unicianobacterianos obtenidos, se toma 1 ml del cultivo y sé centrífuga a 2,500 rpm por 5 minutos, el pellet es lavado 3 veces con 1 ml de medio f/2 para eliminar las posibles bacterias contaminantes, y resuspender en 1 ml de medio f/2.

2.- Sonicar por 5 minutos a una amplitud de 80 W, con pulsaciones cada 3 segundos (Sonicador Ultrasonic procesor. GE 100-CE)

3.- Centrifugar 5 minutos a 2,500 rpm y resuspender en un tubo eppendorf con 500 µl de buffer SE (0.125 M NaCl, 0.05 M EDTA pH 8).

3.- Centrifugar por 5 minutos a 10,000 g y resuspender en 340 µl de buffer de lisis (25 % w/v sacarosa, 50 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8), mezclar con vórtex y agregar 15 µl de lisozima (2 mg/ml).

4.- Incubar a 37 °C por 1.30 h

5.- Adicionar 8 µl de Sarcosil al 25 % w/v y 2 µl de Proteinasa K (10 mg/ml).

6.- Incubar a 55 °C por 30 minutos.

7.- Adicionar 55 µl de NaCl 5M, 45 µl de CTAB 10 % (previamente calentado en el microondas 5 seg a potencia 4.

8.- Incubar a 65 °C por 20 minutos.

9.- Agregar un volumen de 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitar con vórtex y centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.

10.- Separar la fase acuosa y transferirla a un microtubo nuevo y extraer con 1 volumen de fenol, agitar con vortex y centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.

11.- Separar la fase acuosa y extraer con un volumen de cloroformo:alcohol isoamilico, agitar con vórtex y centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.

12.- Agregar 5 µl de RNAasa e incubar a 37 °C por 30 minutos.

13.- Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto e incubar a –20 ºC por 20 minutos.

14.- Recuperar el DNA centrifugando a 14,000 rpm por 10 minutos. Descartar el sobrenadante por decantación y lavar 2 veces con 1 ml de etanol al 70 %, centrifugando a 14,000 rpm por 5 minutos.

15.- Decantar el sobrenadante y secar en el SAVANT por 10 minutos.

16.- Resuspender en 50 µl de agua bidestilada filtrada y estéril o mQ.

***6.- Geles de poliacrilamida al 7.5 %.***

1.- Preparar una solución de bis-acrilamida al 30 %

2.- En un tubo de 50 ml limpio, colocar 2.6 ml de la solución bis-acrilamida al 30 %, 2.56 ml de buffer TBE al 10 %, 4.84 ml agua destilada, 100 µl de PSA y 8 µl de TEMED.

3.- Vaciar la mezcla con cuidado en los vidrios para geles de acrilamida y esperar que polimerice.

4.- Polimerizado el gel, se desmonta y se coloca en la cámara para iniciar la corrida.

***7.- Purificación con fenol-cloroformo***

1.- Cortar la banda de DNA con navaja

2.- Colocar el fragmento de agarosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar 200 µl de agua destilada estéril.

3.- Colocar en hielo seco hasta congelar, retirar y machacar con un pistilo varias veces, repetir 3 veces.

4.- Agregar 100 µl de fenol y dar vórtex por 1 minuto, 100 µl de cloroformo y dar vórtex por 1 minuto.

5.- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.

6.- Recuperar la fase acuosa y agregar 1/25 volúmenes de NaCl 5M y 2 ½ volúmenes de etanol absoluto. Mezclar y precipitar en hielo seco por 1 hr.

7.- Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos y decantar el sobrenadante.

8.- Agregar 1 ml de etanol al 70 %, dar vórtex y centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos. Decantar el sobrenadante y secar el DNA al vació por 5 minutos.

9.- Resuspender el DNA en 20 µl de $H_2O$ dd estéril.