

BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

# **ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**"Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*"**

**TESIS DE GRADO**

**Previa a la obtención del título de  
ACUICULTOR**

**Presentada por**

**Fernando Tapia Ortega**

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**1996**

# DEDICATORIA



BIBLIOTECA  
CIV. DE  
MEXICO

A MIS PADRES,

*Carlos y Rosa*

A MI FAMILIA

# AGRADECIMIENTO



BIBLIOTECA  
DEL CENAIM  
MARICAO

En primer lugar quisiera agradecerle a Dios por darme vida y por permitir que mi familia continúe a mi lado en este maravilloso mundo.

A mis padres Carlos y Rosa que han estado en todo momento de mi vida, por su apoyo perenne y desinteresado, por todo el amor que me han dado, muchas gracias viejos.

A mis hermanos, a Celia, en fin a toda mi familia por esperar ansiosos la culminación de mis estudios universitarios.

Un agradecimiento muy especial al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, así como a su Director, Jorge Calderón V., Ph. D. por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis.

A la Doctora Jenny Rodríguez, quién supo dirigirme en la realización de esta tesis, así como la ayuda que me brindó en la redacción de este documento.

A Erik Mialhe, supervisor de esta tesis por sus críticas, comentarios y por sacrificar su valioso tiempo en la corrección de este documento.

Un especial agradecimiento a la Bióloga Camila Parra, a Msc. Lorena Scharwz por su amistad y por su perenne ayuda en todo este tiempo.

Al Acuicultor Marcelo Muñoz, por haber colaborado desinteresadamente en la ejecución de esta tesis y por enseñarme el verdadero valor de una amistad sincera, Gracias Marcelo.

A una persona quien fue pilar fundamental durante casi toda mi vida universitaria, y la que ha estado junto a mi lado siempre, por la paciencia y aguante que ha tenido conmigo.

Gracias Isabel

Quisiera agradecer muy sinceramente a la familia Tomalá, por todo el tiempo compartido, por la amabilidad, y por la comprensión que han tenido conmigo.

A Mara, Lorena, Marcelo, Ernesto, Mario, Javier, Arturo, Geovanny, en fin a todos mis amigos quienes pasamos parte de nuestras vidas en el CENAIM, gracias por compartir este tiempo en armonía.

# DECLARACION EXPRESA

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

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



BIOLOGIA  
FAC. CIEN.  
MARIELA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Tapia O". The signature is written over a horizontal line.

Fernando Tapia Ortega

*Henry Alvarez A*

---

Henry Alvarez, Ae.  
Presidente del Tribunal



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

*Jerry Landívar*

---

Jerry Landívar, M. Sc.  
Miembro del Tribunal

*Jenny Rodríguez*

---

Jenny Rodríguez, Ph. D.  
Director de Tesis

# TABLA DE CONTENIDOS

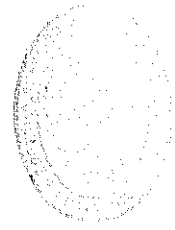


BIBLIOTECA  
FAC. CS.  
MARITIMA

Tabla de contenidos.....	i
Abreviaturas.....	iii
Índice de figuras.....	v
Índice de tablas.....	vii
Resumen.....	x
Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	2
1.1. Inmunidad en artrópodos.....	2
1.1.1. Inmunidad en insectos.....	3
1.1.1.1. Factores antibacterianos constitutivos.....	4
1.1.1.2. Factores antibacterianos inducibles.....	6
1.1.1.3. Factores antivirales en insectos.....	12
1.1.2. Inmunidad en limulus.....	12
1.1.2.1. Factores antibacterianos en limulus.....	13
1.1.2.2. Factores antivirales en limulus.....	15
1.1.3. Inmunidad en crustáceos.....	15
1.1.3.1. Factores antibacterianos humorales.....	18
2. MATERIALES Y METODOS.....	20
2.1. Material biológico.....	20
2.1.1. Camarones y hemolinfa.....	20
2.1.2. Cepas bacterianas.....	21
2.2. Técnicas bacteriológicas.....	21
2.2.1. Medios de cultivo.....	21
2.2.2. Indicadores de pH.....	22
2.2.3. Manejo del stock bacteriano.....	23
2.2.4. Estimación de la concentración de bacterias.....	24
2.3. Métodos de detección de la actividad antibacteriana.....	24
2.3.1. Método de zona de inhibición (ZI).....	24
2.3.2. Método turbidométrico (MT).....	25
2.3.3. Método de unidades formadoras de colonias (UFC).....	27

2.4. Inducción de la actividad antibacteriana en el plasma del camarón <i>Penaeus vannamei</i> .....	28
2.5. Análisis estadístico.....	29
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
3.1. Métodos para detectar y cuantificar la actividad antibacteriana del plasma del camarón <i>Penaeus vannamei</i> .....	30
3.1.1. Método de zona de inhibición (ZI).....	31
3.1.2. Desarrollo y optimización de un ensayo turbidométrico para cuantificar la actividad antibacteriana del plasma del camarón <i>Penaeus vannamei</i> .....	33
3.1.3. Método de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	47
3.1.4. Ensayos con indicadores de pH.....	52
3.2. Estudio de la inductibilidad de la actividad antibacteriana en el plasma del camarón <i>Penaeus vannamei</i> .....	57
3.3. Aplicaciones del ensayo antibacteriano turbidométrico (EAT).....	60
3.3.1. El EAT como herramienta para estudiar la respuesta inmunitaria contra <i>Vibrio harveyi</i> .....	60
3.3.2. El EAT en la detección de características antibacterianas de proteínas plasmáticas.....	62
CONCLUSIONES.....	65
RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69
ANEXOS.....	76

## **ABREVIATURAS**



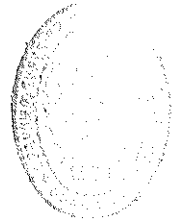
INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
MARACAIBO

A.B.A:	Alimentos balanceados
A.P.:	Agua de peptona
ARN:	Acido ribonucleico
C.M.:	Caldo marino
C.M.G.B.:	Caldo marino con glucosa más azul de bromotimol
C.M.G.R.:	Caldo marino con glucosa más rojo de fenol
C.M.M.B.:	Caldo marino con maltosa más azul de bromotimol
C.M.M.R.:	Caldo marino con maltosa más rojo de fenol
CB:	Control del crecimiento bacteriano
CP:	Control plasma
D.O.:	Densidad óptica
E.D.T.A.:	Etilén diamino tetra-acético
EAT:	Ensayo antibacteriano turbidométrico
ILJ:	<i>Vibrio alginoliticus</i>
kDA:	Kilodaltons
L.B.:	Luria Bertani
L.B.A.B.:	Luria Bertani con arabinosa más azul de bromotimol
L.B.A.R.:	Luria Bertani con arabinosa más rojo de fenol
L.B.G.B.:	Luria Bertani con glucosa más azul de bromotimol
L.B.G.R.:	Luria Bertani con glucosa más rojo de fenol
LPS:	Lipopolisacáridos
$\mu$ :	micras
MIC:	Concentración mínima inhibitoria
$\mu$ l:	microlitros
mM:	milimolar



MT:	Método turbidométrico
nm:	nanometros
P.:	Pourros
PO:	Fenoloxidasa
proPO:	Profenoloxidasa
rpm:	Revoluciones por minuto
UFC:	Unidades formadoras de colonias
w/v:	Relación peso sobre volumen
ZI:	Zona de inhibición

## INDICE DE FIGURAS



BIBLIOTECA  
FAC. CIEN.  
MARINAS

Figura 1: Vías bioquímicas que podrían estar relacionadas con la producción de sustancias melanóticas durante la respuesta inmune de artrópodos.....	5
Figura 2: Aglutininas.....	6
Figura 3: Estructura tridimensional de la cecropina.....	8
Figura 4: Poro transmembranario formado por las cecropinas.....	9
Figura 5: Acción de los hemocitos del cangrejo herradura ( <i>Limulus</i> ) contra microorganismos invasores.....	14
Figura 6: Sistema inmunitario de los crustáceos.....	17
Figura 7: Ensayo antibacteriano de zona de inhibición.....	26
Figura 8: Halos de inhibición del crecimiento de <i>V. anguillarum</i> alrededor de hoyos, en los que se ha depositado diferentes muestras de plasma de camarón <i>P. vannamei</i> .....	32
Figura 9: Crecimiento de diferentes bacterias expresado en unidades de densidad óptica, después de la exposición al plasma de camarón <i>P. vannamei</i> ; utilizando CM como medio de cultivo para los <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml.....	37
Figura 10: Crecimiento de diferentes bacterias expresado en unidades de densidad óptica, después de la exposición al plasma de camarón <i>P. vannamei</i> ; utilizando Agua de peptona como medio de cultivo para los <i>Vibrios</i> y para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> Pourros a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias por ml.....	40

Figura 11: Crecimiento de diferentes bacterias expresado en unidades de densidad óptica, después de la exposición al plasma de camarón <i>P. vannamei</i> ; utilizando CM como medio de cultivo para los <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $13 \times 10^6$ bacterias por ml.....	43
Figura 12: Protocolo antibacteriano turbidométrico optimizado.....	46
Figura 13: Concentración de <i>E. coli</i> después de la exposición al plasma de <i>P. vannamei</i> de animales inducidos por inyección de bacterias vivas.....	60
Figura 14: Crecimiento de <i>V. harveyi</i> con diferentes muestras de plasma.....	62



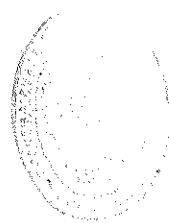
BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
BAGOTIMA

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diámetro de halos de inhibición del crecimiento bacteriano ( <i>V. anguillarum</i> ).....	32
Tabla 2: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando CM para el cultivo de <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 1.....	35
Tabla 3: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando CM para el cultivo de <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 2.....	35
Tabla 4: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando CM para el cultivo de <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 3.....	36
Tabla 5: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando AP para el cultivo de <i>Vibrios</i> y P para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 4.....	38
Tabla 6: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando AP para el cultivo de <i>Vibrios</i> y P para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 5.....	39
Tabla 7: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando AP para el cultivo de <i>Vibrios</i> y P para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 6.....	39
Tabla 8: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando CM para el cultivo de <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $13 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 7.....	41

Tabla 9: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando CM para el cultivo de <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $13 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 8.....	42
Tabla 10: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando CM para el cultivo de <i>Vibrios</i> y LB para <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> a una concentración de $13 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 9.....	42
Tabla 11: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 1.....	47
Tabla 12: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 2.....	48
Tabla 13: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 3.....	48
Tabla 14: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 4.....	49
Tabla 15: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 5.....	49
Tabla 16: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $40 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 6.....	50
Tabla 17: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $13 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 7.....	50
Tabla 18: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $13 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 8.....	51
Tabla 19: UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de $13 \times 10^6$ bacterias/ml. Experimento 9.....	51
Tabla 20: Viraje de color y variación de las absorbancias a 620 nm utilizando tres diferentes medios de cultivo sembrado con <i>V. anguillarum</i> .....	55
Tabla 21: Viraje de color y variación de las absorbancias a 620 nm utilizando tres diferentes medios de cultivo sembrado con <i>V. harveyi</i> .....	55

Tabla 22: Variación de las absorbancias al poner en contacto plasma con medio de cultivo.....	56
Tabla 23: Distribución de frecuencias del porcentaje de inhibición a 0 (control), 6, 12 y 24 horas.....	59
Tabla 24: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando 8 muestras de plasma contra la bacteria <i>V. harveyi</i> .....	61
Tabla 25: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando hemocianina de <i>P. vannamei</i> contra la bacteria <i>E. coli</i> .....	63
Tabla 26: Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando hemocianina de <i>P. vannamei</i> contra la bacteria <i>E. coli</i> .....	64



BIBLIOTECA  
FAC. MED.  
MARÍLIA

## RESUMEN

El estudio de técnicas y ensayos inmunológicos que permitan evaluar la capacidad de respuesta inmunitaria del camarón *Penaeus vannamei*, surge como alternativa para la acuicultura.

En el presente trabajo se optimizaron tres ensayos para determinar la actividad antibacteriana del plasma de *Penaeus vannamei*. Para este fin, se desarrolló e implementó un ensayo turbidométrico para cuantificar la capacidad antimicrobiana del plasma, así también fueron explorados los ensayos de unidades formadoras de colonias y de zona de inhibición, como herramientas para cuantificar y detectar, respectivamente la respuesta antibacteriana del plasma contra las bacterias.

Para evaluar la eficacia del ensayo turbidométrico se realizó un experimento de inducción *in vivo*, inyectando las bacterias *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli* utilizadas como estimulante. Finalmente mediante el ensayo turbidométrico se detectó una potente actividad antimicrobiana en una muestra de hemocianina purificada de camarón *P. vannamei*.

## INTRODUCCION

El cultivo de camarón en nuestro país ha constituido un fenómeno mundial, si consideramos que esta industria comenzó a desarrollarse a finales de los setenta convirtiéndose al Ecuador en poco más de una década en el segundo productor de camarón en el mundo (1988). Sin embargo la carencia del desarrollo tecnológico así como una pobre estrategia de expansión de la industria ha provocado que el sector afronte un sinnúmero de dificultades que han ocasionado una drástica disminución en la producción del crustáceo.

Por otra parte diversos factores que favorecen la destrucción del habitat y la propagación de enfermedades son originados por manejos inadecuados de sistemas de cultivo, contaminación generada por el descargo de desechos agrícolas e industriales, uso indiscriminado de antibióticos y la misma sobreexplotación del recurso que además ha devastado extensas áreas de manglares extinguiendo diversas especies animales que hacen de estas zonas su habitat natural. Todos estos factores han contribuido a la generación de condiciones adversas ocasionando un desequilibrio entre el camarón y el medio en el que se cultiva. Este desequilibrio influiría sobre el estado fisiológico del animal siendo por esto de vital importancia el estudio de la respuesta inmunitaria de los camarones.

Considerando que criterios asociados a mecanismos inmunitarios servirían como marcadores del estado fisiológico, es de vital importancia la implementación de técnicas y ensayos inmunológicos para evaluar la capacidad de respuesta inmunitaria de los camarones. El presente trabajo se ha focalizado en el desarrollo y optimización de ensayos que permitan precisar las propiedades antibacterianas del plasma y determinar el carácter inducible de esta actividad en el camarón *Penaeus vannamei*. Estos ensayos serían herramientas útiles para evaluar eficientemente los efectos que provocarían parámetros físicos-químicos y biológicos sobre el sistema inmunitario de los camarones y la respuesta de éste ante el ataque de un patógeno.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. INMUNIDAD EN ARTROPODOS

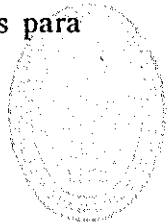
La capacidad de defensa contra patógenos es una característica de todas las especies. Los artrópodos carecen de una respuesta inmune específica (Christensen & Nappi, 1988), sin embargo son capaces de reconocer y destruir invasores foráneos por medio de diversos mecanismos, los cuales involucran los constituyentes celulares y humorales presentes en la hemolinfa (Söderhall & Cerenius, 1992), que se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente patógenos.

Esta respuesta inmune se presenta en dos fases, una fase inmediata que está directamente relacionada con los mecanismos celulares y una segunda fase caracterizada por la síntesis de efectores humorales que estimulan la producción de factores antimicrobianos circulantes, los cuales incrementan la resistencia del huésped por un corto período de tiempo (Chadwick & Dunphy, 1986). Los factores antimicrobianos son sustancias naturales que han sido detectadas en la hemolinfa de los artrópodos y otros invertebrados, cuya función es de ejercer un efecto perjudicial sobre microorganismos invasores. Estos factores pueden ser de carácter constitutivo y/o inducible, siendo constitutivos si se los halla constantemente en el sistema circulatorio de artrópodos, e inducibles, si estos a más de estar presentes en la hemolinfa, aumentan en cantidad ante alguna clase de estímulo, como generalmente sucede en los insectos. Entre estas sustancias existen algunas moléculas microbicidas caracterizadas por ser catiónicas, de bajo peso molecular y capaces de ejercer una acción lítica dirigida hacia las membranas de las bacterias. A estas moléculas se las ha denominado péptidos o polipéptidos antibacterianos.

Muchas moléculas antibacterianas han sido caracterizadas en vertebrados, invertebrados, plantas e incluso en bacterias, sin embargo, esta actividad antibacteriana no tiene un

carácter estrictamente inducible en todos los invertebrados, sino mas bien de tipo constitutivo.

Los estudios de los mecanismos inmunitarios de los artrópodos, en cuanto se refiere a los insectos, han sido motivados por la importancia económica y médica que estos animales representan. En el caso más específico de los crustáceos su explotación en la acuicultura ha motivado un creciente interés sobre los procesos inmunitarios, sin embargo los estudios de estos mecanismos en crustáceos son limitados y la información disponible es extremadamente escasa. Los conocimientos alcanzados en relación a los factores humorales en otros artrópodos (insectos y *limulus*) pueden ser aprovechados para incrementar la comprensión de estos factores en camarones *peneidos* .



#### 1.1.1. Inmunidad en insectos

BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

En el planeta existen aproximadamente un millón de especies de animales, de los cuales 960.000 son invertebrados y de esta cantidad 850.000 especies son artrópodos. El 90% de estos últimos 850.000 artrópodos lo representan los insectos.

Muchos insectos normalmente habitan en ambientes en los cuales están presentes una gran variedad de patógenos y parásitos, requiriendo un sistema de defensa eficiente para combatir a estos microorganismos (Engström, 1992).

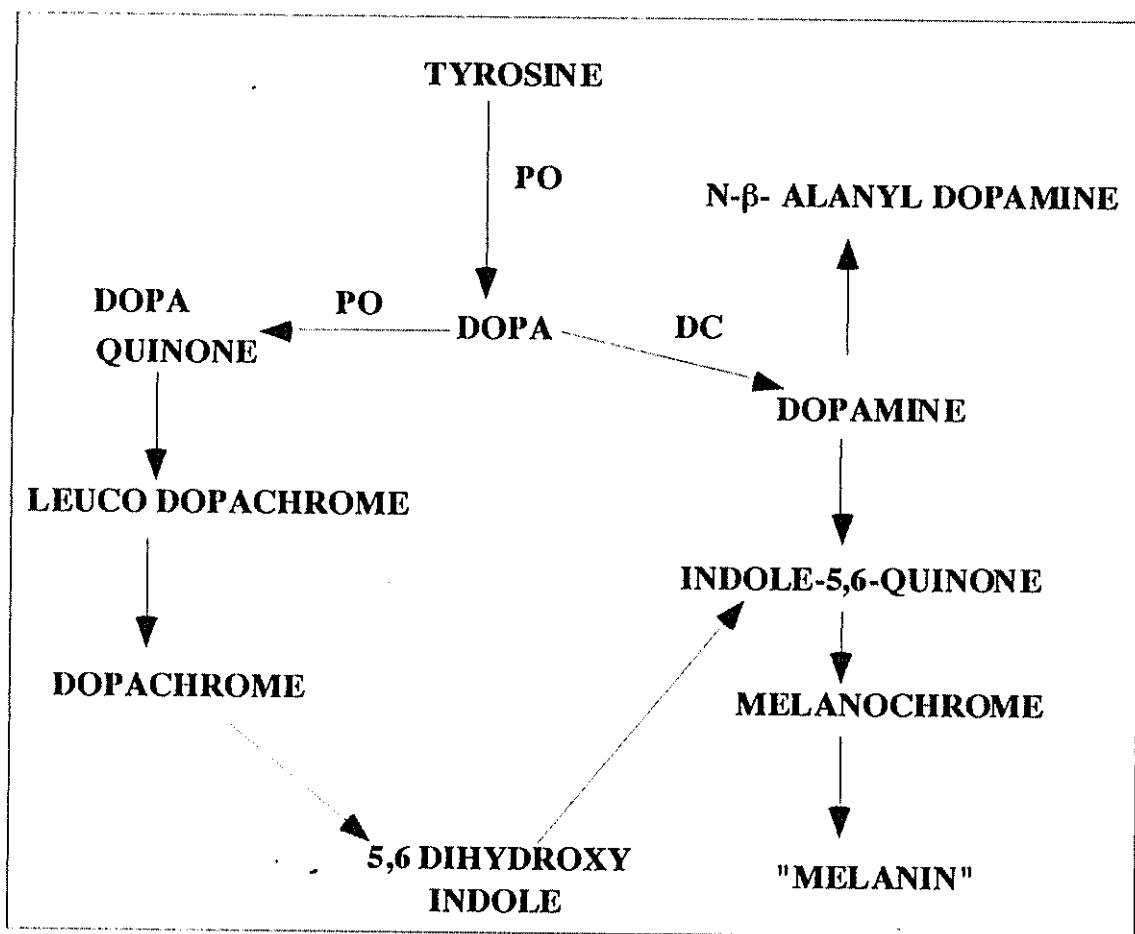
Los estudios de las reacciones de defensa antibacterianas en los insectos fueron explorados a finales del siglo pasado, posterior al descubrimiento de la fagocitosis por Metchnikoff (1884) en el crustáceo *Daphnia pulex*. Veinte años después, Glaser, Paillet y Metalnikow (1904) determinaron que adicionalmente a la fagocitosis, los insectos contaban con reacciones de defensa humoral eficientes. Esta respuesta inmunitaria humoral es principalmente inducida, por factores circulantes cuya síntesis se realiza previa infección por bacterias (gram +/-), lipopolisacáridos (LPS) e incluso por presencia de

heridas. Después de que los microorganismos entran en contacto con los hemocitos o con los factores circulantes de reconocimiento, una señal es transmitida a las células responsables de la síntesis de proteínas inmunes (Faye, 1990). El paso siguiente en el desarrollo de la inmunidad es la síntesis de ARN y su respectiva traducción en proteínas específicas, las cuales constituyen los péptidos y polipéptidos responsables de la actividad antibacteriana (Boman & Hultmark, 1987). Algunas de estas sustancias tienen función antibacteriana, mientras que otras tienen función desconocida, sin embargo existen indicios de que actuarían como factores de reconocimiento, receptores solubles o aglutininas (Kanost *et al.*, 1990).

#### 1.1.1.1. Factores antibacterianos constitutivos

Algunos factores antibacterianos importantes están normalmente presentes en los hemocitos y en la hemolinfa sin que se necesite una estimulación previa para su producción.

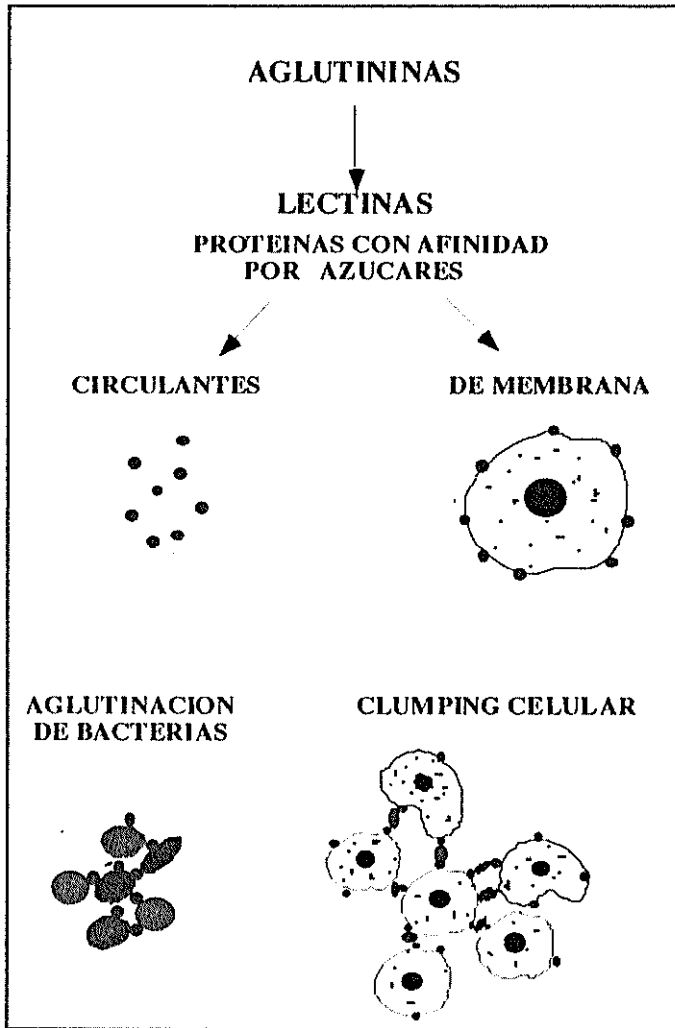
La fenoloxidasa es una enzima sumamente reactiva que se encuentra permanentemente en invertebrados y probablemente se almacene en forma de profenoloxidasa inactiva. El producto final de la reacción de la fenoloxidasa es la melanina (Fig. 1), un material oscuro insoluble que se deposita alrededor de microorganismos o parásitos durante la formación de nódulos y cápsulas. Conjuntamente con los componentes que forman los nódulos, la melanina formaría una barrera mecánica, evitando el crecimiento de parásitos atrapados en ésta. Es también posible que los intermediarios de la formación de la melanina pudieran ser tóxicos para los organismos invasores.



**Figura 1:** Vías bioquímicas que podrían estar relacionadas con la producción de sustancias melanóticas durante la respuesta inmune de artrópodos. PO, Fenoloxidasa; DC, descarboxilasa (Tomado de Christensen & Nappi, 1988)

En la hemolinfa de insectos existen proteínas capaces de fijarse a lipopolisácaridos y aglutinar bacterias, denominadas lectinas o aglutininas. Estas moléculas participarían en el reconocimiento de partículas extrañas y en la opsonización. Cabe indicar que estas proteínas pueden ser de carácter constitutivo o inducible.

Rowley y Ratcliffe (1980) determinaron que lectinas presentes en insectos no inducidos contribuían en la eliminación de microorganismos invasores, fomentando una aglutinación acelerada, la que conduce a la formación de grandes masas bacteriales (Fig. 2) ideales para la fagocitosis y la formación de nódulos (Chadwick & Dunphy, 1986).



BIBLIOTECA  
FAC. ISS,  
MARIKINA

**Figura 2:** Aglutininas

#### 1.1.1.2. Factores antibacterianos inducibles

Muchos de los factores antibacterianos en insectos son de carácter inducible. La inducción artificial de estos factores en insectos generalmente se realiza mediante la inoculación de bacterias.

Glaser, Paillot y Metalnikow (1904) determinaron que mediante la inyección de bacterias atenuadas a insectos se obtenía, en pocas horas, resistencia a subsecuentes inyecciones

(dosis letales) de bacterias virulentas. Se estipuló que una potente actividad antibacteriana podría estar relacionada con la inducción de esta resistencia.

Chadwick en 1975 registró una potente actividad antibacteriana en la mariposa *Galleria mellonella* poco después de haberla infectado con bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*). En los gusanos de seda *Hyalophora cecropia* y *Antheraea pernyi*, la actividad antibacteriana tuvo una duración de 7 a 8 días, declinando y desapareciendo después de un tiempo aproximadamente igual al requerido para alcanzar la máxima actividad.

La lisozima fue el primer factor antibacteriano purificado a partir del gusano *Galleria mellonella* (Powning & Davidson, 1976), dicha enzima fue encontrada en los hemocitos y en el intestino de algunos insectos. Esta proteína se encuentra entre los factores antibacterianos que pueden ser tanto de carácter inducible como constitutivo.

La lisozima aislada a partir del gusano *Hyalophora cecropia* (Hultmark *et al.*, 1980) contiene 120 aminoácidos y un peso molecular de 13,8 kDa, presentando una gran similitud con las lisozimas de los vertebrados. Las bacterias gram positivas y gram negativas son susceptibles a dicha enzima (Boman & Hultmark, 1987).

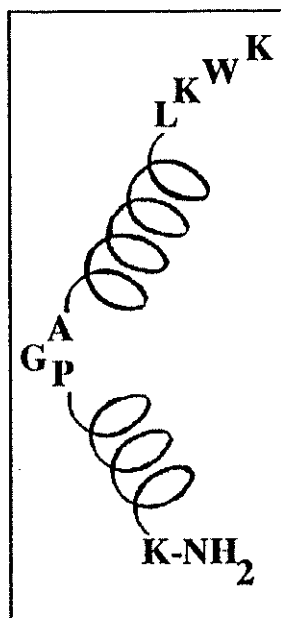
Los péptidos antibacterianos inducibles en insectos se han agrupado en dos familias de acuerdo a la estructura tridimensional de la molécula y han sido divididas en péptidos en forma de hélice, los cuales están representados por las cecropinas y en péptidos de configuración  $\beta$  con puentes disulfuro, los cuales están representados por las defensinas.

Adicionalmente, se han caracterizado y clasificado otros péptidos, los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares entre ellos, clasificándolos como péptidos ricos en prolina y péptidos ricos en glicina (Cociancich, *et al.*, 1994).

En 1980 Boman y colaboradores fueron los primeros en aislar y caracterizar un péptido antibacteriano inducible del gusano *Hyalophora cecropia*, el cual fue denominado cecropina (Boman & Hultmark, 1987).

Las cecropinas constituyen una familia de proteínas fuertemente básicas, con pesos moleculares de aproximadamente 4 kDa y han sido aisladas de una variedad de especies de insectos pertenecientes al orden lepidóptera y díptera, incluso un péptido antibacteriano tipo cecropina ha sido aislado del intestino del cerdo.

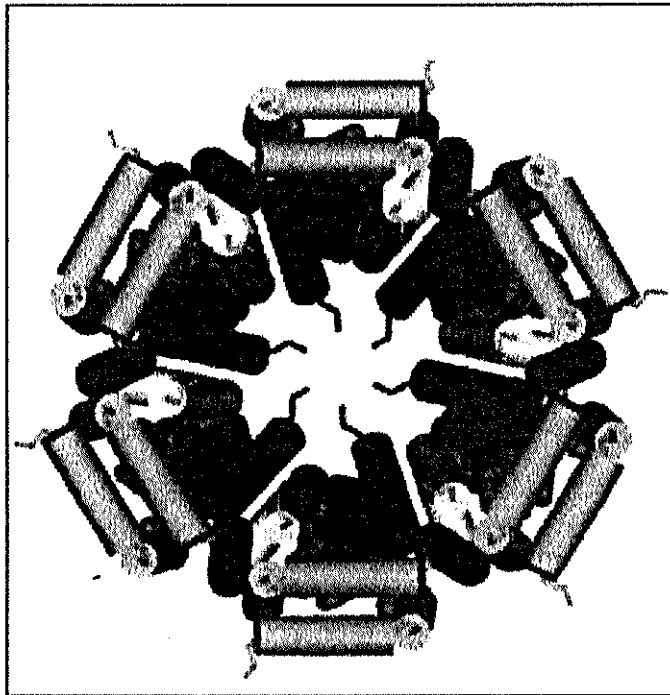
Las cecropinas tienen entre 35 y 39 residuos de aminoácidos. Su estructura tridimensional (Fig. 3) tiene forma de doble hélice; la hélice N-terminal tiene carga positiva (básica) y es anfipática, mientras que la hélice C-terminal aminada tiene carga negativa o neutral y es hidrofóbica.



**Figura 3:** Estructura tridimensional de la Cecropina (Tomado de Cociancich, *et al.*, 1994)

Se determinó que el modo de acción de las cecropinas está ligado a la capacidad de insertarse en las capas lipídicas de las membranas y formar canales destruyendo a los microorganismos. La hélice N-terminal cargada positivamente se une a la superficie de la membrana bacteriana cargada negativamente, mientras que la hélice C-terminal penetra al centro de la membrana. Subsecuentemente un potencial positivo empuja la hélice N-terminal en la membrana, formándose un canal por la asociación de múltiples hélices N-

terminal transmembranarias, de tal manera que los residuos hidrofílicos formen un poro acuoso (Fig. 4) y los residuos hidrofóbicos estén en contacto con la fase alifática de la membrana (Cociancich, *et al.*, 1994; Durell *et al.*, 1992).



BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DE  
MAR DEL PLATA

**Figura 4:** Poro transmembranario formado por las cecropinas (Tomado de Durell, *et al.*, 1992)

La detección de la actividad antibacteriana de las cecropinas se basó en la eliminación de bacterias al ser expuestas a éstas, manteniendo en paralelo un control del crecimiento bacteriano (sin la exposición a estos péptidos antimicrobianos). La cuantificación del efecto antibacteriano de estos péptidos se realizó mediante tres técnicas diferentes, la primera monitoreando el conteo de las bacterias viables después de ponerlas en contacto con las cecropinas y comparándolas con las bacterias que no fueron expuestas a éstas. La segunda técnica cuantificó la absorción de luz que se encuentra relacionada con la turbidez producida por el crecimiento bacteriano, realizando la misma comparación efectuada en la primera técnica, y la tercera estimó la actividad de las cecropinas contra bacterias midiendo las zonas de inhibición en delgadas placas de agar y cuantificando la



concentración mínima inhibitoria (MIC) que se obtuvo a partir de diluciones de una solución madre de cecropinas.

Algunos miembros de esta familia de péptidos han sido aislados de insectos, como por ejemplo la sarcotoxina I, aislada del díptero *Sarcophaga peregrina* (Okada & Natori, 1985), otros péptidos como la lepidopterana y la bactericidina aisladas de los lepidópteros *Bombyx mori* (Teshima, *et al.*, 1986) y *Manduca sexta* (Dun, *et al.*, 1985), respectivamente. Debido a los múltiples nombres que se han dado a estas moléculas en diferentes insectos, y que hacen la literatura confusa, Boman y Hultmark (1987) han propuesto que estos factores antibacterianos que presentan homología entre sí, sean llamados cecropinas.

Hoffman y colaboradores, (1980) aislaron del díptero *Phormiaterranovae* un péptido antibacteriano de carácter inducible al que denominaron defensina, por la similaridad de secuencia con las defensinas encontradas en mamíferos. Por otra parte Natori y colaboradores, (1985) aislaron de la mosca *Sarcophaga peregrina* un péptido al que se denominó Sapecina, el mismo que resultó ser una isoforma de la defensina.

Las defensinas son catiónicas y poseen entre 34 y 43 residuos de aminoácidos, con excepción de la royalisina (una defensina de las abejas), todas contienen 6 cisteínas engranadas en tres puentes disulfuros intramoleculares. La estructura tridimensional de la defensina de la *Phormiaterranovae* posee 3 partes principales: la primera formada por un bucle N-terminal, constituido por los residuos 1-13, el cual tiene cierto grado de flexibilidad; la segunda por una hélice central anfipática compuesta por los residuos 14-24 y la tercera formada por una hoja  $\beta$  antiparalela compuesta por los residuos 27-40.

Las defensinas aisladas de la *Phormia terranovae* actúan contra bacterias gram positivas, aunque no se conoce su modo de acción con precisión, esta molécula posee una fuerte afinidad con un lípido encontrado en las membranas de las bacterias (Cociancich, *et al.*, 1994). Las defensinas son citotóxicas, con actividad membranolítica sobre una gran

variedad de microorganismos, eliminando bacterias gram positivas y gram negativas, hongos y ciertos virus (Boman & Hultmark, 1987).

En la actualidad se han aislado alrededor de once isoformas de defensinas distribuidas en los órdenes *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Trichoptera*, *Hemiptera*, *Odonata* e incluso han sido encontradas en los escorpiones.

Algunas moléculas, que presentan en un alto porcentaje de prolina en su composición, han sido denominados péptidos ricos en prolina. Estos péptidos presentan actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y gram negativas. De las abejas se han logrado aislar la apidaecina que es un péptido inducible rico en prolina con un peso molecular aproximado de 2 kDa y con 18 residuos de aminoácidos y la abaecina (Casteels, *et al.*, 1990), que posee 34 residuos de aminoácidos, la cual en su composición contiene un 30% de prolina y con un peso molecular aproximado de 4 kDa.

A las moléculas antibacterianas de mayor tamaño, que presentan en su composición bioquímica un alto porcentaje de residuos de glicina, se las ha clasificado como polipéptidos ricos en glicina. Estos polipéptidos presentan una potente actividad contra bacterias gram negativas y gram positivas.

Hultmark y colaboradores en 1988 aislaron del gusano *Hyalophora cecropia* seis isoformas de atacinas. Las atacinas son polipéptidos inducibles ricos en glicina con un peso aproximado de 20 kDa y que presentan una fuerte actividad antibacteriana contra bacterias gram negativas.

Adicionalmente se han detectado otros péptidos de este tipo denominados dipterocinas, los cuales han sido aislados de la mosca *Phormia terranova* (Dimarcq, *et al.*, 1988) y *Sarcophaga peregrina* (Ishikawa, *et al.*, 1992). Las dipterocinas de la *P. terranova*, de aproximadamente 9 kDa y la sarcotoxina II de 24 kDa de peso molecular poseen una gran actividad antibacteriana contra bacterias gram negativas.

En la actualidad se conocen alrededor de 70 péptidos antibacterianos y la lista no cesa de aumentar (Anexo 1).

### 1.1.1.3. Factores antivirales en insectos

Existe escasa información acerca de los factores antivirales en invertebrados. Al igual que los factores antibacterianos, la mayor parte de las investigaciones en la identificación de estos factores han sido realizadas en insectos.

Sherman en 1985 manifestó la presencia de actividad antiviral mediante la producción de factores tipo interferon, los cuales ocasionan interferencia tanto con virus homólogos como con virus heterólogos.

La inducción de proteínas inmunitarias en larvas de saltamontes *Trichoplusia ni*, relacionadas con atacinas, cecropinas y lisozimas de *Hyalophora cecropia* no influyó en la protección de la infección viral ocasionada por baculovirus. Por otra parte la infección con baculovirus provocó un aumento de algunas proteínas de la hemolinfa incluyendo las proteínas antibacterianas (Andersons, *et al.*, 1990).

Unicamente se ha registrado una comprobada actividad antiviral en el intestino del gusano de seda *Bombyx mori* (Funakoshi & Aizawa, 1989).

### 1.1.2 Inmunidad en limulus

En el *Phylum* Artrópoda existe un animal, que ha habitado en la Tierra por casi 200 millones de años perteneciente al *subphylum* *Chelicerata* y clase *Merostomata*, (llamado también limulus o cangrejo herradura). En el Japón se ha estudiado extensamente el sistema inmunitario de este artrópodo, cuyo cuerpo tiene forma de herradura y está

provisto de una larga cola espinosa. Actualmente existen sólo tres géneros: *Tachypleus* y *Carcinospinus*, que se los encuentra en la costa Sureste de Asia y *Limulus*, que se lo halla en la costa de Norte América.

La hemolinfa de este invertebrado contiene muchas sustancias biológicamente activas, como factores de coagulación y potentes péptidos antimicrobianos, que contribuyen a la defensa contra microorganismos patógenos invasores (Iwanaga, 1993).

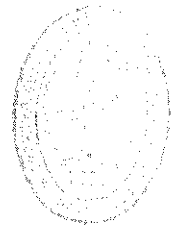
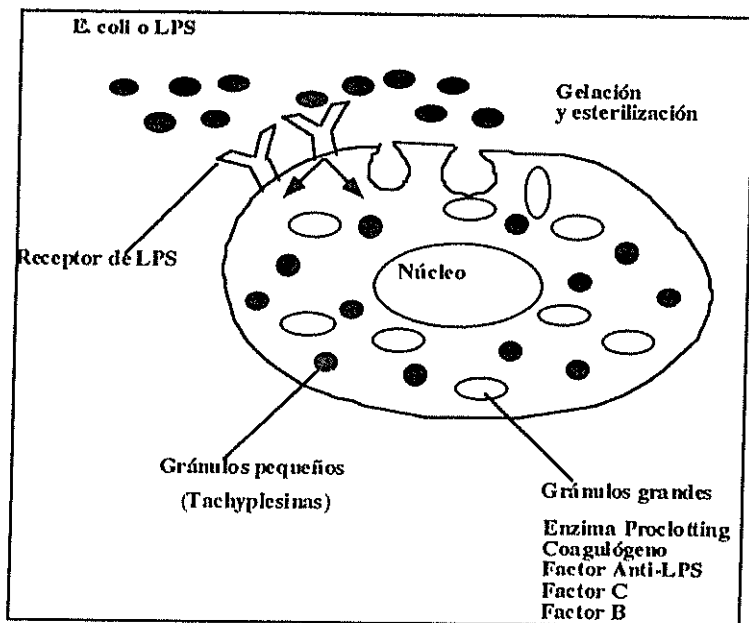
#### 1.1.2.1 Factores antibacterianos en limulus

Cuando los hemocitos del limulus han sido expuestos a endotoxinas bacterianas (LPS), propias de la membrana externa de bacterias gram negativas, se induce la activación del sistema de coagulación. Durante la separación de los componentes proteícos pertenecientes al sistema de coagulación, se ha identificado un potente anticoagulante denominado factor anti-LPS. Esta proteína catiónica de 102 residuos de aminoácidos, inhibe específicamente la activación de uno de los factores de coagulación, el factor C, que inicia la cascada de coagulación del limulus (Fig. 5). Este factor anti-LPS tiene un potente efecto microbicida sobre bacterias gram negativas (Tanaka *et al.*, 1982; Morita *et al.*, 1985; Aketagawa *et al.*, 1986; Muta *et al.*, 1987).

Adicionalmente al descubrimiento de este factor se detectó en el extracto de los hemocitos del "Japanese Horseshoe crab" *Tachypleus tridentatus*, un péptido catiónico denominado taquiplesina. La taquiplesina tiene un peso molecular de 2,2 kDa aproximadamente y su estructura está formada por 17 residuos de aminoácidos con dos puentes disulfuros y un carbono terminal aminado (Nakamura *et al.*, 1988).

Paralelo al aislamiento de la taquiplesina, se detectaron varias estructuras similares a este péptido (isopéptidos), los que se denominaron taquiplesina II y polifemusina I y II,

obtenidas a partir de la lisis de hemocitos del "American Horseshoe crab" *Limulus polyphemus* (Miyata; *et. al.*, 1989).



BIBLIOTECA  
 I. B. I.  
 MEXICO

**Figura 5:** Acción de los hemocitos del cangrejo herradura (*Limulus*) contra microorganismos invasores. La endotoxina bacteriana [lipopolisacáridos (LPS)] contacta con un receptor de LPS o proteína de unión de LPS, el cual está probablemente localizado en la membrana plasmática de la célula. A través de este contacto, algunas reacciones celulares inducen la fusión de gránulos con la membrana plasmática, provocando una liberación de los componentes de los gránulos grandes en el plasma. Esta exocitosis activa el sistema de coagulación intracelular y el coagulo generado durante la activación inmoviliza los invasores. Las tachyplesinas y factores anti-LPS liberados de gránulos pequeños y grandes respectivamente, actúan como sustancias bactericidas.

La polifemusina es un péptido catiónico de 2kDa aproximadamente, compuesto de 18 residuos de aminoácidos que presenta actividad antibacteriana tanto contra bacterias gram negativas y gram positivas, así como contra el hongo *Candida albicans M9* y *Cryptococcus*. Las tachyplesinas y las polifemusinas probablemente se encuentran ubicadas en la membrana de los hemocitos, convirtiendo al sistema de defensa de estos invertebrados primitivos, en un mecanismo eficiente de combate contra microorganismos.

Estudios realizados sobre los mecanismos de acción antibacteriana de la tachyplesina indican que el blanco predominante de la acción bactericida serían otros constituyentes de

la membrana externa diferentes de los LPS. La taquiplesina permeabilizaría la membrana externa de las bacterias y despolarizaría la membrana citoplasmática. (Ohta, *et al.*, 1992).

#### 1.1.2.2. Factores antivirales del limulus

Los trabajos realizados para determinar factores antivirales en el limulus se han hecho utilizando taquiplesina I e isopéptidos del "Japanese Horseshoe crab" *Tachypleus tridentatus* contra virus que atacan a humanos. El virus de la estomatitis vesicular y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV) fueron inactivados, mientras que los virus del herpes tipo 1 y 2, adenovirus 1, reovirus 2 y polivirus 1 fueron resistentes a la inactivación (Murakami *et al.*, 1991).

#### 1.1.3. Inmunidad en crustáceos

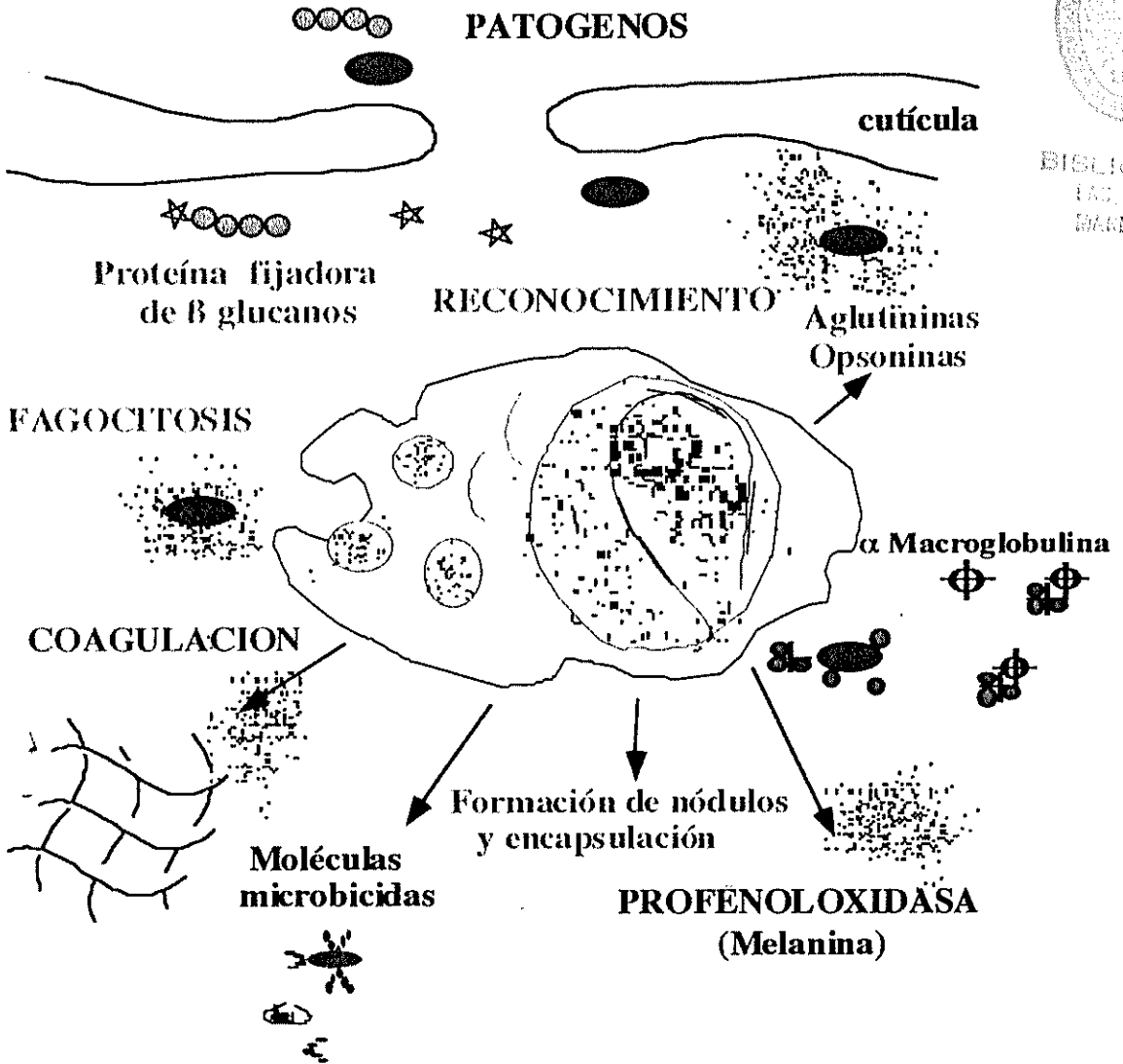
El primer proceso de la respuesta inmune en crustáceos es el reconocimiento de los microorganismos invasores, realizado por proteínas del sistema inmunitario encargadas de la identificación de partículas extrañas. Estas moléculas reconocen residuos glucídicos que se encuentran en las paredes celulares de los microorganismos, tales como  $\beta$  1-3 glucanos de hongos, LPS de bacterias gram negativas y peptidoglicanos de bacterias gram positivas. Cuando el reconocimiento de microorganismos invasores se ha realizado, se ponen en marcha varios mecanismos de la respuesta inmediata no inducida, como la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos, coagulación, aglutinación y sistema proPo (Fig. 6).

Los eventos post-fagocitarios en los crustáceos involucran a los lisosomas, que son estructuras intracelulares que poseen una gran cantidad de enzimas, como las lisosimas, fosfolipasa A2, ribonucleasas, desoxiribonucleasas y proteasas, que conjuntamente

participan en la destrucción de organismos atrapados, catalizando la hidrólisis de las paredes de las bacterias (Prescott, *et al.*, 1993)..

Existen proteínas que cumplen un papel importante en los sistemas de defensa (Renwranz, 1983, 1986), precipitando moléculas y aglutinando partículas extrañas, para facilitar la fagocitosis. La caracterización de aglutininas ha conducido frecuentemente a la identificación de lectinas o hemaglutininas, que se unen en forma específica y reversible a carbohidratos (Lis & Sharon, 1973; Goldstein & Hayes, 1978; Barondes, 1981). Las lectinas de crustáceos causan aglutinación de diferentes tipos de células, como de eritrocitos en los mamíferos o de bacterias (Ratanapo & Chulavatnatol, 1990; Vargas-Albores, 1995; Söderhall & Cerenius, 1992; Kopacek, *et al.*, 1993).

# EL SISTEMA INMUNITARIO EN LOS CRUSTACEOS



BIBLIOTECA  
Dpto. de  
BIOLOGIA

Figura 6: Sistema Inmunitario de los crustáceos



Algunas reacciones de defensa de crustáceos son acompañadas por la melanización del microorganismo invasor (Söderhall, 1982; Söderhall & Smith, 1986). La melanización es un proceso generalmente asociado a heridas e infecciones. La melanina resulta de la transformación enzimática de núcleos fenólicos y de la polimerización no enzimática de los quinones (Lercha, 1988). Tanto la melanina como sus precursores tienen propiedades microbicidas (Kuo & Alexander, 1967; Söderhall & Ajaxon, 1982; Saint Leger *et al.*, 1988; Rowley *et al.*, 1990). La enzima que funciona como llave de la síntesis del pigmento melanina, es la fenoloxidasa (Po), la cual está presente en los hemocitos de crustáceos en forma de una pro-enzima inactiva, la profenoloxidasa (proPo). La proPo es excitada a partir de granulocitos y activada en Po por componentes de las paredes celulares de microorganismos, como los  $\beta$  1-3 glucanos, LPS y peptidoglicanos (Söderhall & Smith, 1983).

#### 1.1.3.1. Factores antibacterianos humorales

Este aspecto de la respuesta inmunitaria comienza a ser explorado, siendo detectada una fuerte actividad microbicida constitutiva en los hemocitos y en el suero de diferentes crustáceos (Chisholm & Smith, 1992; Chisholm & Smith, 1994; Noga, *et al.*, 1994; Chisholm & Smith, 1995).

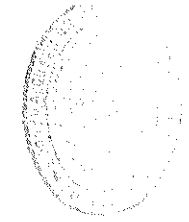
Itami y colaboradores (1989) determinaron en *Penaeus japonicus* un incremento en la protección contra vibriosis, después de la inoculación de bacterias muertas. Igualmente se describieron incrementos en la actividad microbicida contra *Vibrios* (*V. alginolicus*, *Vibrio anguillarum*) en animales inmunoestimulados por inoculación de bacterias muertas (Adams, 1991; Sung, *et al.*, 1996).

A pesar de estos resultados aún no se ha podido determinar (como en los insectos) una real estimulación de la producción de moléculas antibacterianas. Sin embargo este campo

comienza a ser explorado activamente por algunos equipos de investigación, centrándose en ciertos crustáceos de interés comercial cuya producción representa considerables ingresos económicos. Schnapp y Smith (1996) aislaron el primer péptido antibacteriano (rico en glicina) presente en los hemocitos del cangrejo *Carcinus maenas*, este péptido tiene 6,5 kDa, con potente capacidad microbicida contra bacterias gram positivas y negativas.

Actualmente está en curso la purificación de péptidos antimicrobianos aislados a partir del plasma del camarón *Penaeus vannamei*. (Bachère, comunicación personal, 1996).

El reconocimiento, aislación y caracterización bioquímica de factores humorales, así como la estructuración y determinación de su función, es necesario para la elaboración de péptidos sintéticos que podrían ser utilizados en el tratamiento de enfermedades, eliminando la dependencia y resistencia que puedan ocasionar los antibióticos, en el tratamiento de infecciones.



INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE GUAYAQUIL  
MAR 1988

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **2.1.1. Camarones y hemolinfa**

Los animales utilizados se obtuvieron de las camaroneras FUENTES y LANEC ubicadas en las zonas de Palmar y Engunga respectivamente, en la provincia del Guayas. Los animales que se usaron para el desarrollo y optimización de los ensayos y para la inducción de la actividad antibacteriana tenían un peso entre 3 a 12 g. Los animales fueron sometidos a un período de aclimatación de 15 días, manteniéndolos en tanques transparentes de fibra de vidrio, redondos y de fondo plano de 500 litros de capacidad, con flujo continuo de agua y aireación constante.

Los camarones fueron alimentados diariamente con el 3% de su biomasa en tres raciones, utilizando balanceado con 25% de proteína (Alimentos Balanceados, ABA) en la mañana y en la tarde, y calamar en la noche.

La hemolinfa fue obtenida de animales en intermuda, la extracción de la misma se realizó a nivel del sinus ventral con una jeringuilla de 1 ml (Safty syringe 27 GX1/2) cargada con 100 µl de Citrato de Sodio al 10% (340 mM, pH; 7,2) utilizado como anticoagulante. Los volúmenes de hemolinfa extraída fueron registrados antes de transferirlos a microtubos (0,5 ml, Eppendorf Biopur) igualando posteriormente volumen a volumen hemolinfa y anticoagulante. Las muestras de hemolinfa fueron centrifugadas (Biofuge 13, Heraeus Sepatech) a 3000 rpm durante 10 minutos descartando los hemocitos y recuperando el plasma, el cual fue almacenado a -80°C (congelador REVCO). Todo el procedimiento para la obtención de hemolinfa se hizo en hielo y manteniendo condiciones asépticas para lo cual fue necesario trabajar con material estéril y en una cámara de flujo laminar (Air Tech Japan, Ltd. Mod.BCM-1002W).

### 2.1.2. Cepas bacterianas

Las bacterias utilizadas fueron:

*Vibrio harveyi*

*Vibrio anguillarum*

*Vibrio alginoliticus*

*Escherichia coli D31*

*Micrococcus luteus*

La cepa de *Vibrio alginoliticus* fue aislada e identificada bioquímicamente por Ileana Morales en 1994, de una muestra de agua de mar en el laboratorio de larvas de camarón EBISA.

La cepa bacteriana *Vibrio harveyi* fue aislada e identificada bioquímicamente en el CENAIM en 1994 por Jenny Aráuz a partir de una muestra de larvas obtenida en un laboratorio comercial de larvas de camarón.

Las cepas *Vibrio anguillarum*, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus* fueron obtenidas comercialmente y traídas al Ecuador de Francia por la Dra. Evelyne Bachère.

## 2.2. TECNICAS BACTERIOLOGICAS

### 2.2.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados durante la fase de optimización de los ensayos turbidométrico y CFU fueron:

## Medios sólidos

**Lennox L Agar (LB Agar)** (Sigma Chemical Company, L2897). Este medio es recomendado para el crecimiento y mantenimiento de *Escherichia coli*, aunque también fue utilizado para el crecimiento de *Micrococcus luteus* y *Vibrios*, ajustando para las bacterias marinas, la concentración de cloruro de sodio al 2%. Se esterilizó el medio de cultivo por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

**Agar Marino 2216** (Bacto Marine Agar 2216, Difco Laboratories 0979-17-8).

## Medios líquidos

**Luria Bertani Medium (LB) 1% NaCl**. Para la preparación de un litro de este medio se utilizaron 5 g de extracto de levadura, 10 g de bacto tryptona y 10 g de cloruro de sodio en 1 l de agua destilada. Se esterilizó el medio por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

**Pourros (P)**. Un litro de este medio se preparó disolviendo 10 g de bacto tryptona y 10 g de cloruro de sodio en 1 l de agua destilada. Se esterilizó por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

**Caldo Marino 2216 (CM)** (Bacto Marine Broth 2216, Difco Laboratories, 0791-01).

**Agua de peptona (AP)** (Bacto Peptone water dehydrated Difco Laboratories 1807-174).

### 2.2.2. Indicadores de pH

**Azul de bromotimol (AB)** (Bromothymol blue, Fischer Scientific Co. B-388). Este indicador ácido-base presenta un cambio de color del amarillo al azul en el rango de pH 6,0 (amarillo) a 7,6 (azul).

*Rojo de fenol (RF)* (Phenol Red, BDH Indicators). Es un polvo cristalino de color rojo claro a oscuro, con un intervalo de transición visual de color amarillo (pH 6,8) a rojo (pH 8,4).

Estos indicadores de pH fueron adicionados al Caldo Marino y al Luria Bertani, pesando 0,018 g de rojo de fenol para 1 l de medio y 0,003 g de azul de bromotimol para 1 l de medio de cultivo, utilizando Hepes (20mM) como tampon, para mantener el pH a 7,2. Adicionalmente se utilizaron diversos carbohidratos entre los cuales se probaron G-glucosa, maltosa y L-arabinosa a una concentración de 1% (w/v).

### 2.2.3. Manejo del stock bacteriano

Las cepas de trabajo fueron conservadas en tubos de congelación (Criotubos Nunc, 1,8 ml) a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en una solución de glicerol al 15% preparada en medio de cultivo. Es recomendable no descongelar completamente los tubos, ya que las cepas bacterianas pueden sufrir mutaciones. La manipulación de las bacterias se realizó dentro de una cámara de flujo laminar para evitar contaminación de las cepas.

Con la ayuda de un asa estéril, se tocó la superficie congelada sembrando las bacterias por agotamiento en una caja petri con medio sólido. La caja petri se llevó a incubación durante 8 horas, para obtener colonias bacterianas, luego fue puesta a  $-4^{\circ}\text{C}$  para detener el crecimiento bacteriano, utilizando las colonias obtenidas durante 8 días aproximadamente. Una vez obtenidas las colonias bacterianas aisladas, se tomó una colonia con la punta de una asa de platino estéril y se sembró en 4 ml de medio líquido, el cual fue incubado toda la noche, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Antes de utilizarse en los ensayos, el cultivo bacteriano fue repicado en 4 ml de medio de cultivo fresco dejándolo crecer por aproximadamente 2 horas, realizando posteriormente la lectura de la concentración de bacterias utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu corporation, modelo UV-2100). Este procedimiento de siembra fue realizado para asegurar la pureza

de la cepa, y para que las bacterias siempre sean utilizadas durante la fase de crecimiento exponencial.

#### **2.2.4. Estimación de la concentración de bacterias**

Para estimar la concentración de bacterias se realizó una lectura de la densidad óptica del cultivo bacteriano utilizando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Para poder realizar la lectura se efectuó una dilución del cultivo bacteriano en medio de cultivo estéril. Las bacterias se utilizaron en una concentración de  $40 \times 10^6$  y  $13 \times 10^6$  bacterias por ml equivalente a una densidad óptica de 0,03 y 0,01, respectivamente.

### **2.3. METODOS DE DETECCION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

#### **2.3.1. Método de zona de inhibición (ZI)**

##### **Principio**

Este ensayo evalúa el crecimiento de las bacterias en medio sólido mediante la formación de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano, alrededor de un hoyo en el que se ha depositado plasma.

##### **Protocolo (Fig.7)**

Tubos conteniendo un volumen de 10 ml de agar marino estéril fueron mantenidos en baño maría a 45 °C, para evitar su solidificación. En cada uno de estos se inocularon  $2 \times 10^6$  de bacterias y se homogenizaron con la ayuda de un vortex, para inmediatamente ser vertidos en cajas petri, asegurando de esta manera el crecimiento bacteriano en todo el volumen del medio. Una vez que se solidificó el agar, se hicieron 11 perforaciones de

0,6 cm de diámetro, con un instrumento estéril. Cada hoyo tuvo capacidad para 30 µl de plasma, antes de depositar el plasma se permitió que las bacterias crecieran durante 4 horas. Cada caja fue utilizada para 3 muestras (por triplicado), los 2 hoyos restantes consistieron en un control del crecimiento bacteriano (CB) y en un control de inhibición del crecimiento de las bacterias compuesto de EDTA al 5%. Las cajas fueron incubadas por 8 horas, tiempo necesario para la detección de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los hoyos.

### 2.3.2. Método turbidométrico (MT)

#### **Principio**

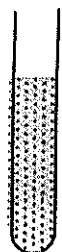
La actividad antibacteriana del plasma de *Penaeus vannamei* fue detectada y cuantificada por la medición de la turbidez de suspensiones bacterianas en un espectrofotómetro lector de microplacas, (Labsystems Multiskan Bichromatic 348) a una longitud de onda de 540 nm, en presencia de plasma de camarón.

#### **Protocolo**

En una microplaca (Corning Glass Work, Round Bottom, 25850) se mezclaron 10 µl de la muestra de plasma (compuesto de 5 µl de plasma y 5 µl de anticoagulante) con 10 µl de suspensión bacteriana (0,03 D.O. a 540 nm), incubando por 1 hora a 25°C. Cada muestra se realizó por triplicado. Se llevó adicionalmente un control de crecimiento bacteriano (CB) el mismo que se realizó sustituyendo el plasma, por 10 µl de una solución de agua de mar al 70% esterilizada mediante filtración (Gelman Sciences 4320, 0,2 µ) e igualada volumen a volumen con anticoagulante.



## ENSAYO ANTIBACTERIANO DE ZONA DE INHIBICION



Cultivo de bacterias en crecimiento exponencial



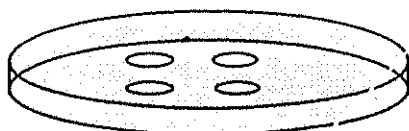
$2 \times 10^6$   
bacterias



Agar fundido  
45 °C

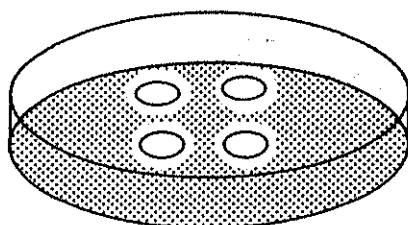
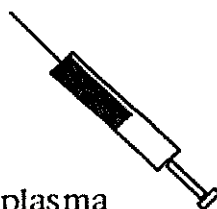
Preparación de una placa de agar

Agitación en el vortex



4 Horas de incubación

Depósito de 30 ul de plasma en perforaciones realizadas en el agar solidificado



6 Horas después: Observación de las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano



BIBLIOTECA  
FAC. MED.  
MAR DEL PLATA

**Figura 8:** Ensayo antibacteriano de zona de inhibición

También se llevó un control del plasma (CP) para cada muestra, el que se realizó con 10 µl de medio de cultivo (caldo marino para los *Vibrios* y LB para *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*), el cual reemplazó la suspensión bacteriana. Después de la incubación se añadió a todos los pozos 190 µl de medio de cultivo, completando un volumen final de 210 µl por hoyo. Enseguida se efectuó una lectura en el espectrofotómetro de microplacas, esta medición se consideró como el tiempo 0, equivalente al blanco, el mismo que fue restado de la lectura obtenida luego de 8 horas de crecimiento bacteriano (incubando a 27°C para los *Vibrios* y a 37°C para *E.coli* y *M. luteus*). Mediante un cálculo simple se obtiene el porcentaje de crecimiento bacteriano de cada muestra, considerando al CB como el 100% del crecimiento. El porcentaje de inhibición de las muestras se determinó restando el porcentaje del crecimiento bacteriano obtenido en los pozos expuestos al plasma de camarón del CB (100%). Se realizaron lecturas a las 2, 4, 6 y 8 horas para llevar una cinética de crecimiento bacteriano.

### **2.3.3. Método de unidades formadoras de colonias (UFC)**

#### **Principio**

Este método consistió en estimar la capacidad microbicida del plasma mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias después de que las bacterias fueron incubadas con plasma.

#### **Protocolo**

Este ensayo permitió cuantificar las unidades formadoras de colonias UFC, mediante un ensayo que puede hacerse en paralelo al método turbidométrico, ya que la primera fase es similar en los dos ensayos. Como se vio anteriormente se mezclaron 10 µl de una muestra de plasma y 10 µl de suspensión bacteriana ( $40 \times 10^6$  bacterias por ml) dejándolos interaccionar durante 1 hora a 25°C, posteriormente se añadieron 190 µl de medio de

cultivo a todos los pozos, de la misma manera que en el ensayo turbidométrico, se realizó un control de crecimiento bacteriano (CB). En este momento se tomaron 10 µl de las muestras y 10 µl de los controles bacterianos, diluyendo 10, 100 y 1000 veces en medio de cultivo, las diluciones fueron realizadas en un volumen final de 100 µl en microtubos (1,5 ml, Eppendorf Biopur) a una temperatura de 4°C para frenar el crecimiento bacteriano. Posteriormente se tomaron 40 µl de la dilución final ( $10^{-3}$ ), homogenizando la suspensión en un vortex (Genie2, Scientific Industries) y sembrando en cajas petri con medio sólido (LB agar). Las cajas fueron llevadas a la incubadora por 8 horas para posteriormente proceder al conteo de las UFC, sobre el medio de cultivo, correlacionando el número de bacterias existentes en las muestras con la de los controles bacterianos.

#### 2.4 INDUCCION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN EL PLASMA DEL CAMARON *PENAEUS VANNAMEI*

Para establecer si la actividad antibacteriana en el camarón *Penaeus vannamei* es constitutiva o inducible, se estimuló a los crustáceos mediante una inyección de bacterias determinando el posible incremento de esta actividad, mediante el ensayo de detección seleccionado.

La inducción de la actividad antibacteriana del plasma de camarón se realizó mediante inyección de 50 µl de una mezcla de dos cepas bacterianas  $1 \times 10^6$  *Escherichia coli* D31 y  $1 \times 10^6$  *Micrococcus luteus*. en el hemocele (sistema circulatorio), en la parte ventral del cuerpo a nivel del último segmento abdominal.

Los camarones fueron divididos en 4 grupos, cada grupo constituido por 3 tanques, los tanques contenían entre 15 y 20 animales, 3 grupos fueron inyectados con bacterias, el grupo restante (control) no fue inyectado y su hemolinfa fue extraída a las 0 horas. A los

otros grupos se les extrajo hemolinfa a las 6, 12, y 24 horas después de la inyección de bacterias.

## 2.5 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS ENSAYOS

Todos los datos de las pruebas realizadas para la implementación del método turbidométrico antibacteriano, fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y el test de Rango Múltiple de Duncan (Super Anova), a un nivel de confianza del 95%. Los resultados obtenidos, con el método antibacteriano turbidométrico, de los ensayos de inductibilidad fueron analizados con ANOVA y el test de Sheffe (Data Desk) con un nivel de confianza del 95%.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. METODOS PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL PLASMA DEL CAMARON *PENAEUS VANNAMEI*

En varios invertebrados y principalmente insectos, se han utilizado varios métodos para detectar y cuantificar la actividad antimicrobiana de la hemolinfa, mediante la aplicación de factores humorales en cultivos bacterianos. Estas técnicas comprenden la medición de la turbidez del medio de cultivo (Método turbidométrico de Anderson & Chain, 1982), el conteo de unidades formadoras de colonias y la detección de zonas de inhibición del crecimiento bacteriano, determinando la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de las bacterias (Boman & Hultmark, 1987).

Algunos de estos métodos se han utilizado para detectar y cuantificar la capacidad antibacteriana de la hemolinfa en varios crustáceos (Chisholm & Smith, 1992; Noga, 1994; Song, *et al.*, 1996).

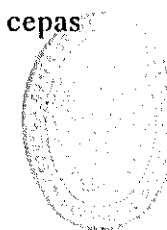
En el presente trabajo se desarrolló ensayos para detectar la actividad antibacteriana del plasma del camarón *Penaeus vannamei*, inicialmente con el método de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Este método presentó el inconveniente de ser cualitativo, imposibilitando por lo tanto la cuantificación de la respuesta antibacteriana. Esto motivó que sea desarrollado un ensayo turbidométrico en busca de una alternativa que permita cuantificar esta actividad. Con la finalidad de optimizar las condiciones del ensayo turbidométrico se exploró la utilización de medios de cultivo que otorguen condiciones desfavorables al crecimiento bacteriano y concentraciones bacterianas que permitan una mejor cuantificación del crecimiento de las bacterias. Las características del protocolo del método anteriormente nombrado han permitido evaluar en paralelo otro ensayo cuantitativo, denominado método de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Esta última técnica permitiría a la vez confirmar los resultados obtenidos con el método turbidométrico.

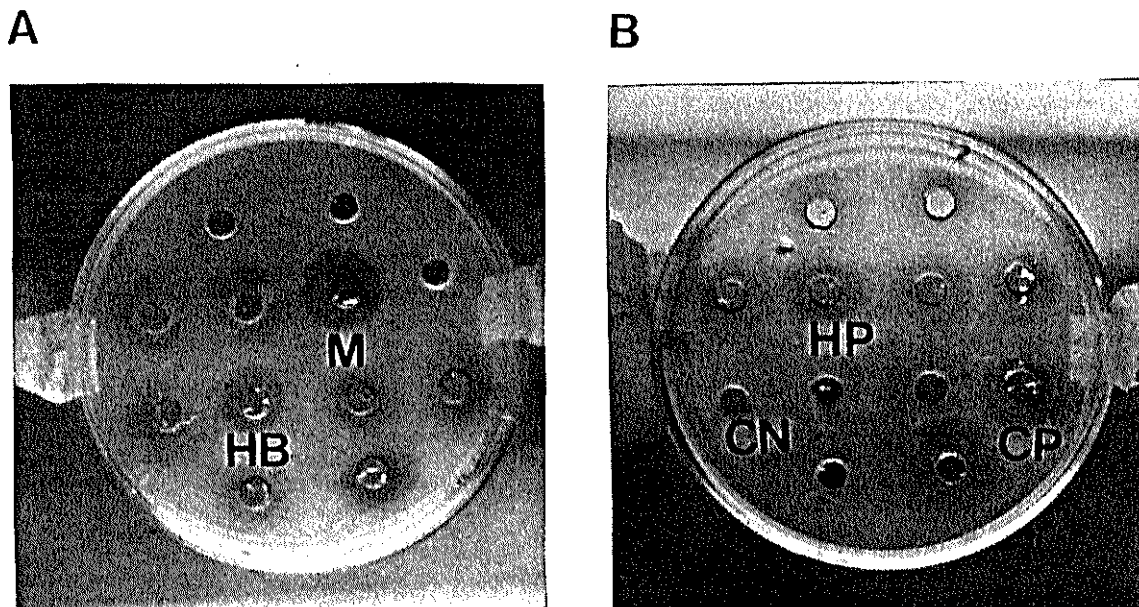
En ambas pruebas cuantitativas se utilizaron diferentes especies bacterianas. Las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos se seleccionaron en base a diferentes criterios. Se utilizó *Micrococcus luteus* debido a las características estructurales de la pared bacteriana (gram positiva), *Escherichia coli* D31 ya que es una bacteria utilizada en muchos laboratorios de inmunología, porque posee un defecto en la pared celular volviéndola más susceptible al efecto antibacteriano. Adicionalmente se eligieron dos bacterias asociadas al camarón, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus* (ILI) por las presuntas características de patogenicidad y probiosis respectivamente, mientras que *Vibrio anguillarum* se escogió principalmente debido a la sensibilidad mostrada en pruebas preliminares. El ensayo turbidométrico, así como el ensayo de las UFC, se realizaron utilizando las cepas bacterianas anteriormente nombradas.

### 3.1.1 Método de zona de inhibición (ZI)

Este método fue utilizado para poder determinar cualitativamente la actividad antibacteriana del plasma de camarón *P. vannamei*. Se realizaron ensayos con muestras de plasma de animales individuales utilizando las bacterias *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*, esta última cepa se reveló particularmente sensible con este método (Fig. 8). En la tabla 1 se presentan valores del diámetro de inhibición utilizando el método de ZI, con 8 muestras de plasma contra *V. anguillarum*.



BIBLIOTECA  
FAC. CIB.  
MAGISTER



**Figura 8:** Halos de inhibición del crecimiento de *V. anguillarum* alrededor de hoyos en los que se ha depositado diferentes muestras de plasma de camarón *P. vannamei*. Foto A: **M** melanina; **HB**: halo bien definido y melanina. Foto B: **CP**: Control positivo; **HP**: halo con poca definición; **CN**: Control negativo

**Tabla 1.** Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (*V. anguillarum*) utilizando 8 muestras de plasma de camarón *P. vannamei*.

Muestra	Diámetro (mm)	
	Caja Petri 1	Réplica
1	1,4	1,6
2	1,7	---
3	1,6	1,6
4	1,7	1,7
5	1,6	1,7
6	---	---
7	1,5	---
8	1,5	---

A pesar de los valores obtenidos es necesario aclarar que este método no permite definir con precisión los halos de inhibición, presentándose varios casos, halos pequeños bien definidos, halos grandes con poca inhibición y halos grandes bien definidos. Adicionalmente la melanina que acompaña muchas veces a estos halos, perturba la medición del diámetro formado por esta inhibición del crecimiento bacteriano, como se puede observar en la figura 8, foto A. Esto podría ser motivado tanto por las concentraciones plasmática de factores antibacterianos así como por factores no controlables en la interacción plasma-agar.

Adicionalmente los resultados obtenidos indican que algunas muestras de plasma de camarón inhiben el crecimiento de los tres *Vibrios*, mientras que otras lo estimulan (mayor crecimiento alrededor del hoyo). De esta forma se confirma la observación hecha anteriormente, de que el plasma actuaría frenando el crecimiento de las bacterias ejerciendo una fuerte actividad inhibitoria o por el contrario, estimularía el crecimiento bacteriano. Se deduce por lo tanto que el plasma del camarón *P. vannamei*, puede constituir un óptimo substrato para estas bacterias. Sin embargo el crecimiento bacteriano puede ser así mismo perturbado por la presencia de factores antibacterianos circulantes. Por otra parte se observó que esta prueba favorece la producción de melanina alrededor de los hoyos, sobre todo cuando se utilizó *V. harveyi* en animales aparentemente sanos provocando una fuerte melanización en los hoyos realizados en el agar.

### **3.1.2. Desarrollo y optimización de un ensayo turbidométrico para cuantificar la actividad antibacteriana del plasma del camarón *Penaeus vannamei***

Para realizar la optimización del ensayo turbidométrico y de las UFC se utilizaron cinco "pools" de plasma (mezcla de plasma de diferentes animales) a fin de disponer de volúmenes importantes, que permitan utilizar las mismas muestras en todas las pruebas.



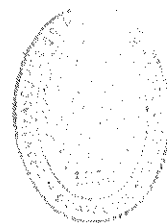
A excepción de la bacteria *Micrococcus luteus* que estuvo disponible posteriormente al desarrollo de estos ensayos y por lo cual se utilizaron muestras individuales de plasma.

Primeramente se realizaron pruebas utilizando una concentración bacteriana de  $40 \times 10^6$  bacterias por ml y como medio de cultivo Caldo Marino para los tres *Vibrios* utilizados y LB para *E. coli* y *M. luteus*. Los resultados de estos ensayos (figura 9 y tabla 2, 3 y 4) indican que las bacterias asociadas al camarón, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, no fueron susceptibles al plasma en ninguna de las pruebas realizadas. Aunque en ensayos preliminares estas bacterias han demostrado una leve disminución del crecimiento cuando fueron tratadas con ciertas muestras de plasma.

El crecimiento acelerado fue característico de estas bacterias, ocasionando depósitos bacterianos en los pozos de las microplacas. En los ensayos realizados con estas bacterias no existieron diferencias significativas entre ninguna de las muestras analizadas y el control del crecimiento bacteriano (CB). Al contrario, el crecimiento bacteriano de *V. anguillarum* y *E. coli* disminuyó notablemente en presencia de plasma.

En estas pruebas los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano cuando se utilizó *V. anguillarum* estuvieron entre el 34 y el 82%, mientras que cuando se utilizó *E. coli*, los porcentajes estuvieron entre el 34 y el 73%, existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras tratadas con plasma y el CB.

Para la bacteria *M. luteus* no existió crecimiento, tanto en los pozos que contenían las muestras de plasma como en los pozos del CB, durante las ocho horas de incubación, obteniéndose bajísimos valores de absorbancia.



BIBLIOTECA  
FAC. BIOD.  
MARILIMA

**Tabla 2.** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando caldo marino para el cultivo de *Vibrios* y Luria Bertani para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento), datos ilustrados en la figura 10. Experimento 1

BACTERIAS									
M	<i>V. harveyi</i> %	<i>V. anguillar</i> %	<i>V. alginol</i> %	<i>E. coli</i> %	<i>M. luteus</i> %				
1	0,869 $\pm$ 0,012	0,197 $\pm$ 0,019	1,016 $\pm$ 0,008	0	0,100 $\pm$ 0,008	47	C1	0,020 $\pm$ 0,007	0
2	0,863 $\pm$ 0,026	0,262 $\pm$ 0,022	1,019 $\pm$ 0,010	0	0,054 $\pm$ 0,030	71	C2	0,012 $\pm$ 0,004	0
3	0,881 $\pm$ 0,014	0,202 $\pm$ 0,018	0,989 $\pm$ 0,015	0	0,051 $\pm$ 0,027	73	C3	0,030 $\pm$ 0,003	0
4	0,869 $\pm$ 0,013	0,258 $\pm$ 0,024	1,007 $\pm$ 0,014	0	0,078 $\pm$ 0,002	59	C4	0,009 $\pm$ 0,002	0
5	0,858 $\pm$ 0,012	0,176 $\pm$ 0,008	1,007 $\pm$ 0,010	0	0,077 $\pm$ 0,001	59	C5	0,018 $\pm$ 0,003	0
CB	0,817 $\pm$ 0,006	0,474 $\pm$ 0,012	0,980 $\pm$ 0,016	0	0,190 $\pm$ 0,013	0	CB	0,006 $\pm$ 0,001	0

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras

C Muestras individuales de plasma

**Tabla 3.** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando caldo marino para el cultivo de *Vibrios* y Luria Bertania para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento). Experimento 2

BACTERIAS									
M	<i>V. harveyi</i> %	<i>V. anguillar</i> %	<i>V. alginol</i> %	<i>E. coli</i> %					
1	0,849 $\pm$ 0,008	0,136 $\pm$ 0,002	0,847 $\pm$ 0,012	0	0,080 $\pm$ 0,008	54			
2	0,841 $\pm$ 0,006	0,204 $\pm$ 0,045	0,855 $\pm$ 0,008	0	0,081 $\pm$ 0,011	55			
3	0,853 $\pm$ 0,006	0,205 $\pm$ 0,001	0,873 $\pm$ 0,012	0	0,076 $\pm$ 0,007	57			
4	0,842 $\pm$ 0,007	0,166 $\pm$ 0,011	0,853 $\pm$ 0,021	0	0,072 $\pm$ 0,006	60			
5	0,849 $\pm$ 0,010	0,190 $\pm$ 0,013	0,857 $\pm$ 0,017	0	0,089 $\pm$ 0,004	50			
CB	0,796 $\pm$ 0,011	0,311 $\pm$ 0,023	0,851 $\pm$ 0,016	0	0,179 $\pm$ 0,002	0			

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras

**Tabla 4.** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando caldo marino para el cultivo de *Vibrios* y Luria Bertani para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de la tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento)

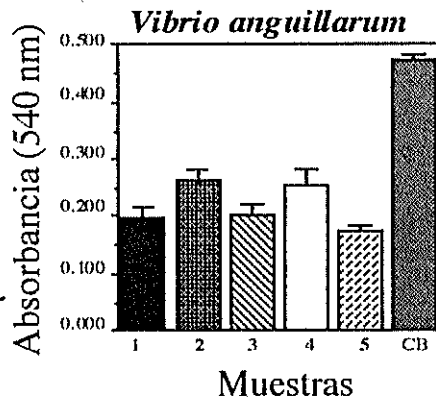
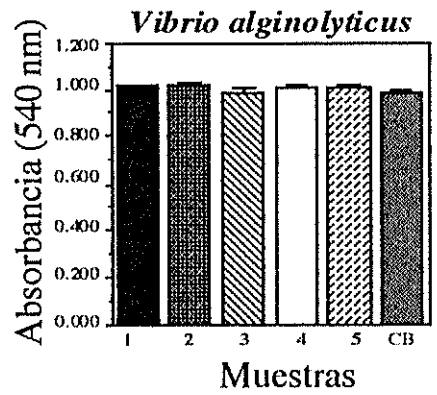
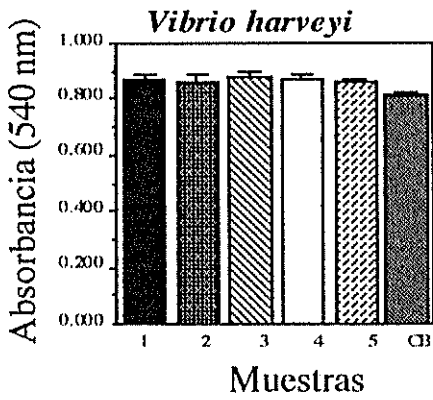
M	BACTERIAS							
	<i>V.harveyi</i>	%	<i>V.anguillar</i>	%	<i>V.alginol</i>	%	<i>E. coli</i>	%
1	0,745 $\pm$ 0,016	0	0,116 $\pm$ 0,024	80	0,703 $\pm$ 0,002	0	0,071 $\pm$ 0,018	61
2	0,769 $\pm$ 0,013	0	0,104 $\pm$ 0,009	82	0,725 $\pm$ 0,017	0	0,115 $\pm$ 0,001	37
3	0,682 $\pm$ 0,020	0	0,114 $\pm$ 0,014	80	0,726 $\pm$ 0,001	0	0,120 $\pm$ 0,003	34
4	0,694 $\pm$ 0,014	0	0,112 $\pm$ 0,010	81	0,713 $\pm$ 0,008	0	0,118 $\pm$ 0,006	35
5	0,685 $\pm$ 0,018	0	0,125 $\pm$ 0,002	78	0,719 $\pm$ 0,010	0	0,118 $\pm$ 0,003	36
CB	0,612 $\pm$ 0,008	0	0,576 $\pm$ 0,037	0	0,671 $\pm$ 0,004	0	0,183 $\pm$ 0,003	0

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

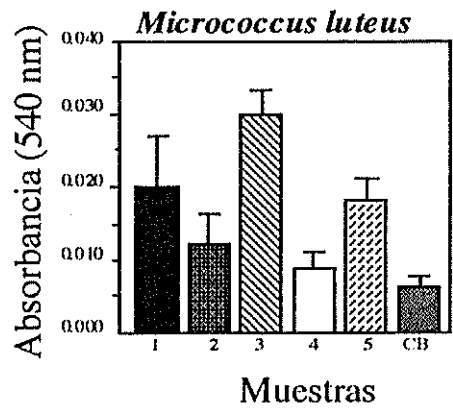
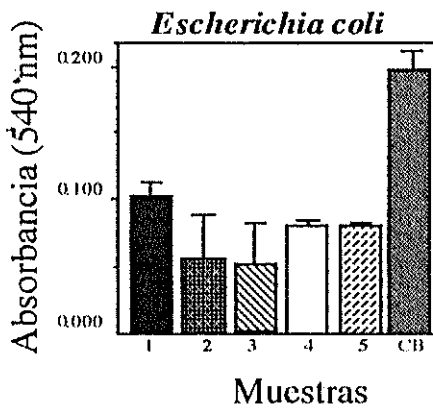
CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras

A fin de conferir condiciones desfavorables al crecimiento bacteriano e influir directamente en la sensibilidad de las bacterias hacia el plasma, se substituyeron los medios de cultivo utilizados inicialmente. Los medios de cultivo usados fueron Pourros para el cultivo de las bacterias *E. coli* y *M. luteus.*, y Agua de Peptona para el crecimiento de *Vibrios*.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MAR DEL PLATA



**Figura 9:** Crecimiento de diferentes bacterias expresado en unidades de D.O., después de la exposición al plasma del camarón *P. vannamei*, utilizando caldo marino como medio de cultivo para los *Vibrios* y Luria Bertani para las bacterias *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml

Los resultados obtenidos (figura 10 y tabla 5,6 y 7), indican que no existió inhibición del crecimiento de ninguno de los *Vibrios* que se cultivaron en Agua de peptona. El crecimiento de las bacterias en los pozos que contenían las muestras de plasma no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el CB. La bacteria *E. coli* presentó susceptibilidad al plasma del camarón *P. vannamei* utilizando Pourros como medio de cultivo, existiendo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el crecimiento bacteriano de las muestras con respecto al CB. Sin embargo en los ensayos realizados, invariablemente se experimentó una disminución del porcentaje de inhibición, si los comparamos con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas inicialmente. Esta disminución podría estar relacionada con el bajo crecimiento de *E. coli* en el medio Pourros.

Las pruebas realizadas con *M. luteus* indican que esta bacteria no es adecuada para cuantificar la eliminación de bacterias, ya que tanto en los pozos que contenían las muestras de plasma, como en el pozo de CB, no se obtuvo crecimiento dentro de las ocho horas de cultivo.

**Tabla 5:** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando Agua de Peptona para el cultivo de *Vibrios* y Pourros para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento), datos ilustrados en la figura 11. Experimento 4

BACTERIAS											
M	<i>V.harveyi</i>	%	<i>V.anguillar</i>	%	<i>V.alginol</i>	%	<i>E. coli</i>	%	<i>M. luteus</i>	%	
1	0,728 $\pm$ 0,019	0	0,748 $\pm$ 0,012	0	0,801 $\pm$ 0,003	0	0,117 $\pm$ 0,021	47	C1	0,007 $\pm$ 0,002	0
2	0,751 $\pm$ 0,015	0	0,815 $\pm$ 0,013	0	0,797 $\pm$ 0,001	0	0,116 $\pm$ 0,007	25	C2	0,003 $\pm$ 0,001	0
3	0,690 $\pm$ 0,006	0	0,732 $\pm$ 0,007	0	0,758 $\pm$ 0,002	0	0,172 $\pm$ 0,019	22	C3	0,001 $\pm$ 0,000	0
4	0,711 $\pm$ 0,002	0	0,737 $\pm$ 0,001	0	0,768 $\pm$ 0,007	0	0,148 $\pm$ 0,008	32	C4	0,004 $\pm$ 0,002	0
5	0,694 $\pm$ 0,006	0	0,691 $\pm$ 0,011	0	0,754 $\pm$ 0,003	0	0,148 $\pm$ 0,010	33	C5	0,002 $\pm$ 0,001	0
CB	0,632 $\pm$ 0,006	0	0,682 $\pm$ 0,009	0	0,732 $\pm$ 0,009	0	0,220 $\pm$ 0,023	0	CB	0,004 $\pm$ 0,001	0

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras

C: Muestras de plasma de individuos

**Tabla 6:** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando Agua de peptona para el cultivo de *Vibrios* y Pourros para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento). Experimento 5

M	BACTERIAS							
	<i>V.harveyi</i>	%	<i>V.anguillar</i>	%	<i>V.alginol</i>	%	<i>E. coli</i>	%
1	0,690 $\pm$ 0,012	0	0,696 $\pm$ 0,007	0	0,751 $\pm$ 0,005	0	0,112 $\pm$ 0,001	38
2	0,651 $\pm$ 0,006	0	0,680 $\pm$ 0,009	0	0,690 $\pm$ 0,003	0	0,119 $\pm$ 0,004	34
3	0,618 $\pm$ 0,009	0	0,677 $\pm$ 0,012	0	0,692 $\pm$ 0,005	0	0,122 $\pm$ 0,004	32
4	0,644 $\pm$ 0,006	0	0,675 $\pm$ 0,006	0	0,531 $\pm$ 0,002	0	0,103 $\pm$ 0,006	43
5	0,619 $\pm$ 0,002	0	0,676 $\pm$ 0,012	0	0,528 $\pm$ 0,002	0	0,100 $\pm$ 0,003	45
CB	0,588 $\pm$ 0,012	0	0,627 $\pm$ 0,012	0	0,529 $\pm$ 0,012	0	0,181 $\pm$ 0,004	0

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras

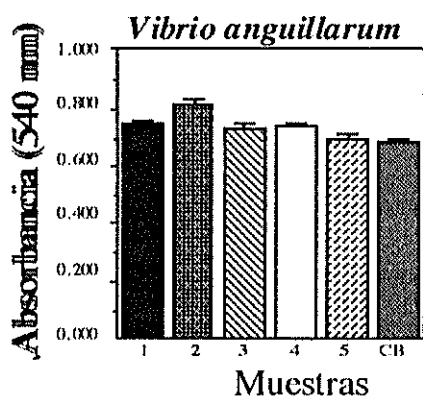
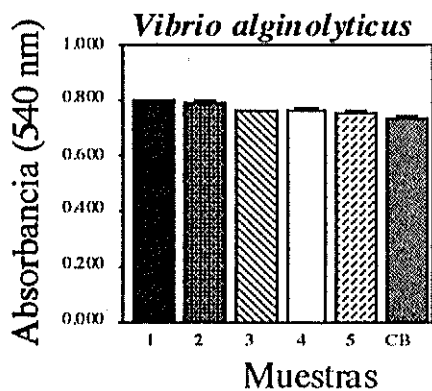
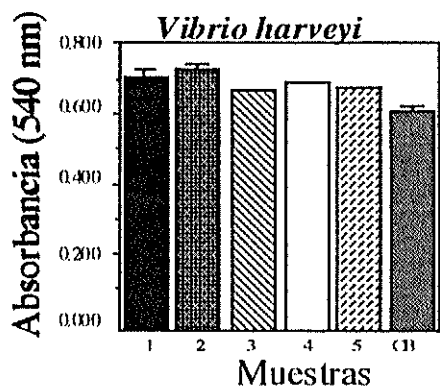
**Tabla 7:** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando Agua de peptona para el cultivo de *Vibrios* y Pourros para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento). Experimento 6

M	BACTERIAS							
	<i>V.harveyi</i>	%	<i>V.anguillar</i>	%	<i>V.alginol</i>	%	<i>E. coli</i>	%
1	0,523 $\pm$ 0,025	14	0,622 $\pm$ 0,029	6	0,683 $\pm$ 0,011	0	0,126 $\pm$ 0,002	32
2	0,595 $\pm$ 0,028	4	0,644 $\pm$ 0,025	2	0,717 $\pm$ 0,010	0	0,122 $\pm$ 0,003	34
3	0,591 $\pm$ 0,008	4	0,681 $\pm$ 0,011	0	0,735 $\pm$ 0,009	0	0,120 $\pm$ 0,001	35
4	0,640 $\pm$ 0,014	0	0,683 $\pm$ 0,031	0	0,709 $\pm$ 0,005	0	0,116 $\pm$ 0,001	37
5	0,576 $\pm$ 0,026	7	0,653 $\pm$ 0,020	1	0,698 $\pm$ 0,018	0	0,125 $\pm$ 0,005	32
CB	0,617 $\pm$ 0,003	0	0,660 $\pm$ 0,016	0	0,678 $\pm$ 0,015	0	0,185 $\pm$ 0,004	0

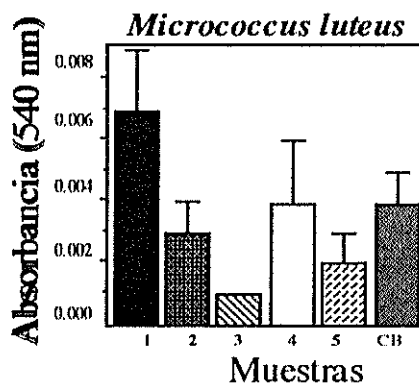
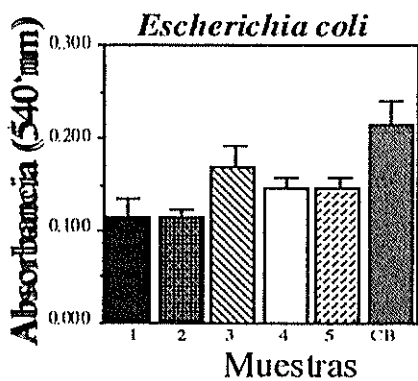
<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA



**Figura 10:** Crecimiento de diferentes bacterias expresado en unidades dE.O., después de la exposición al plasma del camarón *P. vannamei*, utilizando Agua de Peptona como medio de cultivo para los *Vibrios* y para las bacterias *E. coli* y *M. luteus*, a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad de las bacterias al plasma, se disminuyó la densidad bacteriana ( $13 \times 10^6$  bacterias/ml), con respecto a las pruebas realizadas inicialmente  $40 \times 10^6$  bacterias/ml.

Los resultados de estas pruebas (figura 11 y tabla 8,9 y 10) señalan que ningún *Vibrio* fue susceptible al plasma a esa concentración, contrariamente a *E. coli*, cuyo crecimiento presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al CB, aunque con bajos valores de inhibición. Los ensayos realizados con *M. luteus* indican que el crecimiento obtenido (prácticamente nulo) no permite cuantificar la capacidad de eliminación de esta bacteria, ya que no se registró crecimiento en el CB, demostrando nuevamente que esta bacteria no fue la más idónea para este tipo de ensayo.

**Tabla 8:** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando caldo marino para el cultivo de *Vibrios* y Luria Bertani para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento), datos ilustrados en la figura 12. Experimento 7

BACTERIAS											
M	<i>V.harveyi</i>	%	<i>V.anguillar</i>	%	<i>V.alginol</i>	%	<i>E. coli</i>	%	<i>M. luteus</i>	%	
1	-0,354 $\pm$ 0,025	0	0,461 $\pm$ 0,024	0	0,461 $\pm$ 0,024	0	0,156 $\pm$ 0,004	24	<b>C1</b>	0,007 $\pm$ 0,002	0
2	0,345 $\pm$ 0,041	0	0,186 $\pm$ 0,016	0	0,446 $\pm$ 0,022	0	0,146 $\pm$ 0,010	28	<b>C2</b>	0,001 $\pm$ 0,001	0
3	0,464 $\pm$ 0,04	0	0,758 $\pm$ 0,002	0	0,475 $\pm$ 0,028	0	0,162 $\pm$ 0,012	20	<b>C3</b>	0,001 $\pm$ 0,000	0
4	0,354 $\pm$ 0,019	0	0,183 $\pm$ 0,036	0	0,416 $\pm$ 0,005	0	0,151 $\pm$ 0,008	26	<b>C4</b>	0,007 $\pm$ 0,002	0
5	0,341 $\pm$ 0,02	0	0,180 $\pm$ 0,024	0	0,369 $\pm$ 0,006	0	0,163 $\pm$ 0,021	20	<b>C5</b>	0,002 $\pm$ 0,001	0
CB	0,340 $\pm$ 0,024	0	0,180 $\pm$ 0,002	0	0,367 $\pm$ 0,029	0	0,204 $\pm$ 0,003	0	<b>CB</b>	0,007 $\pm$ 0,002	0

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

C: Muestras de plasma de individuos

M Muestras



**Tabla 9:** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando caldo marino para el cultivo de *Vibrios* y Luria Bertani para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento). Experimento 8

BACTERIAS								
M	<i>V.harveyi</i>	%	<i>V.anguillar</i>	%	<i>V.alginol</i>	%	<i>E. coli</i>	%
1	0,409 $\pm$ 0,016	0	0,120 $\pm$ 0,007	0	0,347 $\pm$ 0,031	23	0,119 $\pm$ 0,008	47
2	0,426 $\pm$ 0,056	0	0,141 $\pm$ 0,012	0	0,324 $\pm$ 0,072	28	0,152 $\pm$ 0,005	33
3	0,477 $\pm$ 0,062	0	0,120 $\pm$ 0,015	0	0,457 $\pm$ 0,079	0	0,133 $\pm$ 0,024	41
4	0,487 $\pm$ 0,051	0	0,134 $\pm$ 0,052	0	0,466 $\pm$ 0,019	0	0,141 $\pm$ 0,012	38
5	0,411 $\pm$ 0,042	0	0,126 $\pm$ 0,017	0	0,264 $\pm$ 0,028	41	0,150 $\pm$ 0,016	34
CB	0,399 $\pm$ 0,016	0	0,117 $\pm$ 0,015	0	0,449 $\pm$ 0,014	0	0,228 $\pm$ 0,045	0

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras

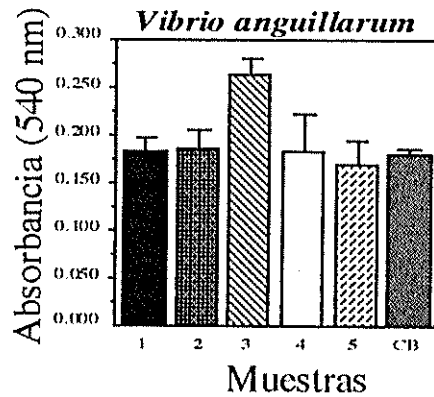
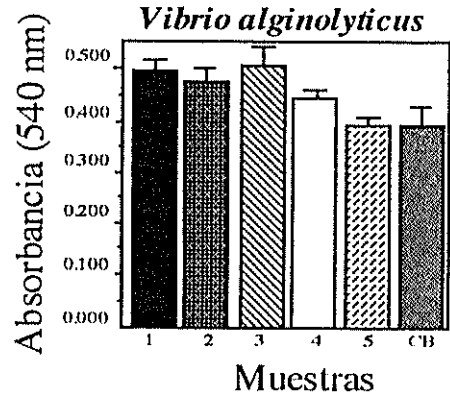
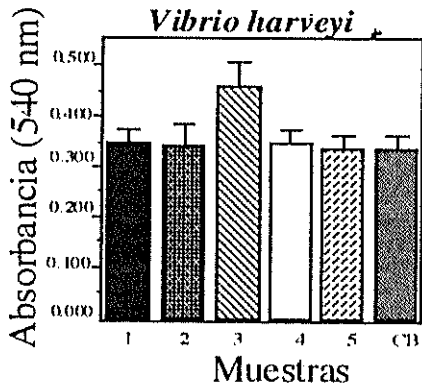
**Tabla 10:** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando caldo marino para el cultivo de *Vibrios* y Luria Bertani para *E. coli* y *M. luteus* a una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento). Experimento 9

BACTERIAS								
M	<i>V.harveyi</i>	%	<i>V.anguillar</i>	%	<i>V.alginol</i>	%	<i>E. coli</i>	%
1	0,355 $\pm$ 0,021	0	0,177 $\pm$ 0,011	6	0,464 $\pm$ 0,015	0	0,159 $\pm$ 0,004	27
2	0,348 $\pm$ 0,041	0	0,194 $\pm$ 0,005	0	0,441 $\pm$ 0,016	0	0,143 $\pm$ 0,010	34
3	0,461 $\pm$ 0,041	0	0,260 $\pm$ 0,009	0	0,472 $\pm$ 0,025	0	0,156 $\pm$ 0,012	28
4	0,351 $\pm$ 0,019	0	0,183 $\pm$ 0,028	3	0,423 $\pm$ 0,003	0	0,154 $\pm$ 0,008	29
5	0,339 $\pm$ 0,023	1	0,171 $\pm$ 0,013	0	0,372 $\pm$ 0,004	0	0,170 $\pm$ 0,019	22
CB	0,343 $\pm$ 0,023	0	0,188 $\pm$ 0,003	0	0,372 $\pm$ 0,026	0	0,218 $\pm$ 0,003	0

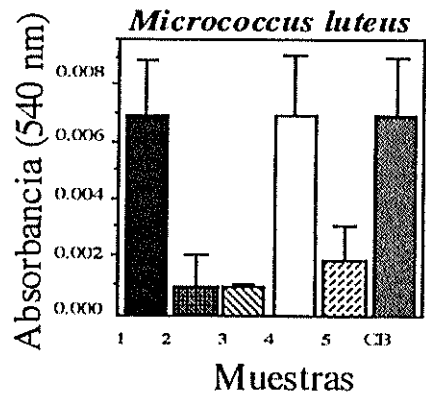
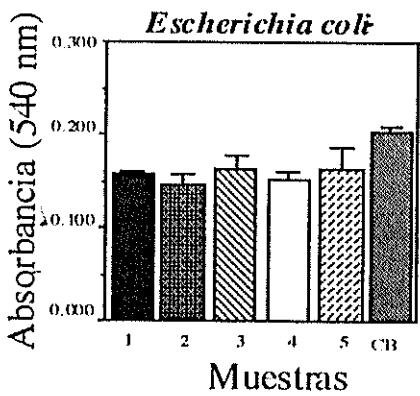
<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control de crecimiento bacteriano

M Muestras



BIBLIOTECA  
FAC. ING. MARITIMA



**Figura 11:** Crecimiento de diferentes bacterias expresado unidades de D.O. después de la exposición al plasma del camarón *P. vannamei*.; utilizando caldo marino como medio de cultivo para los *Vibrios* y para las bacterias *E. coli* y *M. luteus*, LB, a una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml

Todas las pruebas realizadas con *V. harveyi* y *V. alginoliticus* utilizando el método turbidométrico, indican que estas bacterias asociadas al camarón no son suficientemente sensibles para ser usadas en pruebas de cuantificación de la respuesta antibacteriana del plasma. Sin embargo se han encontrado animales cuyo plasma puede inhibir el crecimiento de estas bacterias. La capacidad de defensa que tengan ciertos camarones contra bacterias potencialmente patógenas, como es el caso de *V. harveyi*, se podría utilizar en la selección de organismos resistentes a este posible agente infeccioso.

La bacteria *Vibrio anguillarum* fue susceptible cuando se la utilizó a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml con CM como medio de cultivo, sin existir sensibilidad cuando se utilizó a una concentración menor ( $13 \times 10^6$  bacterias/ml) con este mismo medio de cultivo. Esta bacteria cuando se utilizó Agua de Peptona como medio de cultivo, no fue susceptible al plasma, sin embargo si se comparan las unidades de D.O. del CB, obtenidas con CM y AP se puede observar que aparentemente *V. anguillarum* crece mejor en AP, indicando que tal vez la pérdida de sensibilidad este relacionada, para este *Vibrio*, con mejores condiciones de cultivo utilizando AP.

La bacteria *Escherichia coli* D31 fue susceptible en todas las pruebas realizadas independiente de los medios de cultivo y las concentraciones bacterianas utilizadas. Sin embargo existió mayor sensibilidad cuando se trabajó con LB, a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. La bacteria *Micrococcus luteus* (única bacteria gram positiva utilizada), elegida para realizar el ensayo turbidométrico, no tuvo un crecimiento adecuado (tanto en las muestras como en el CB), el mismo que permitiría cuantificar dentro del tiempo estipulado la actividad antibacteriana del plasma, de tal manera que se descartó a esta bacteria para este tipo de ensayo.

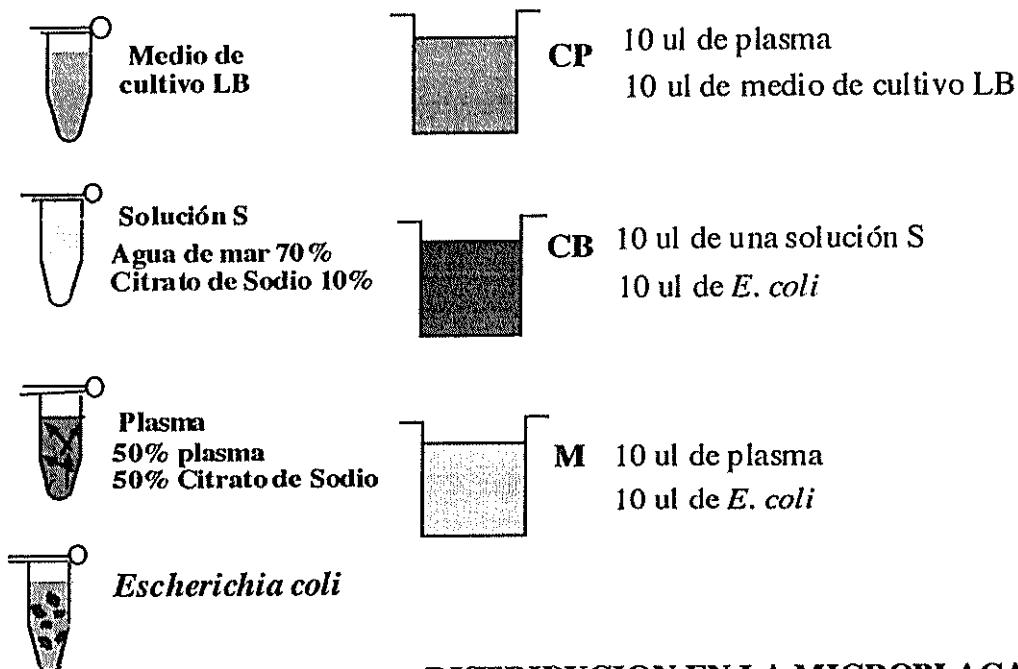
Las experimentaciones anteriormente descritas, han conducido a la implementación y optimización del protocolo para cuantificar la capacidad antibacteriana del plasma por el método turbidométrico, utilizando LB como medio de cultivo y la bacteria *E. coli* a una

concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. Este protocolo será detallado a continuación (figura 12).

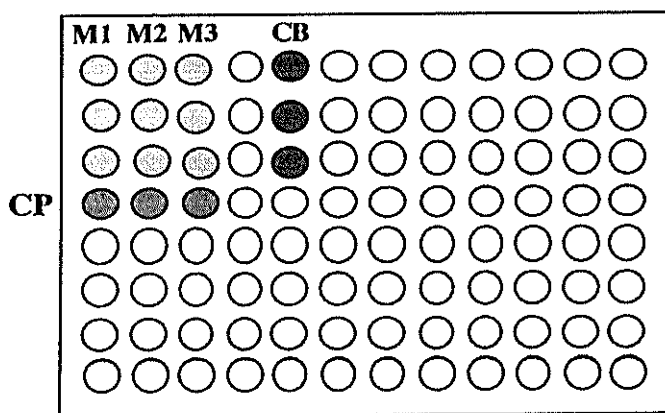
### PROTOCOLO OPTIMIZADO

En una microplaca se distribuyen 10  $\mu$ l de muestra de plasma en cuatro pozos, a tres pozos se añade 10  $\mu$ l de una suspensión de *Escherichia coli* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml, el cuarto pozo constituiría el control del plasma (CP), en este control se sustituye la suspensión bacteriana por 10  $\mu$ l de medio LB. Adicionalmente se lleva un control de crecimiento bacteriano (CB) en la microplaca (preferiblemente se elige una columna de pozos), en el que sustituye el plasma por 10  $\mu$ l de una solución formada por agua de mar al 70% y citrato de sodio al 10% en una relación de volumen a volumen. Se incuba por 1 hora a 25°C aproximadamente. Después de la incubación se añade a todos los pozos 190  $\mu$ l de medio de cultivo (LB), completando un volumen final de 210  $\mu$ l por hoyo. Inmediatamente, se efectúa una lectura en el espectrofotómetro de microplacas, esta medición es equivalente al blanco (tiempo 0 horas). La microplaca es llevada a incubación a 37°C (temperatura óptima de crecimiento para *E. coli*), para luego de ocho horas realizar una segunda lectura a la misma que se restará la lectura obtenida en el tiempo 0 horas, para obtener las absorbancias producidas solamente por el crecimiento de las bacterias. Hay que tener en cuenta que el crecimiento bacteriano en muchas ocasiones provoca depósitos de bacterias en los pozos de las microplacas, lo que impide una correcta cuantificación con el espectrofotómetro, siendo por lo tanto necesario resuspender el cultivo bacteriano de los pozos por agitación en un vortex. Mediante un cálculo simple se obtiene el porcentaje de crecimiento bacteriano de cada muestra, considerando al CB como el 100% del crecimiento. El porcentaje de inhibición de las muestras se saca restando de 100 el porcentaje de crecimiento bacteriano de los pozos que contienen plasma. En lo posible se debe utilizar un mechero cuando la placa es despojada de la tapa para realizar las lecturas para evitar contaminación en los pozos.

## METODO TURBIDOMETRICO OPTIMIZADO



### DISTRIBUCION EN LA MICROPLACA



1 hora de incubación a 25 °C

Colocar 190 ul de medio de cultivo en todos los hoyos

Lectura en el espectrofotómetro a 540 nm

Incubación 8 horas a 37 °C

D.O. en el lector de microplacas a 540 nm

**Figura 12:** Protocolo turbidométrico optimizado

### 3.1.3. Método de las unidades formadoras de colonias (UFC)

El método de las UFC fue efectuado simultáneamente al método turbidométrico, probando las mismas variables en todos los ensayos realizados, permitiendo así comparar ambos métodos de cuantificación. Los datos obtenidos con este ensayo se presentan en las tablas 11,12, 13, 14, 15 16,17, 18 Y 19.

Cuando se utilizó una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml (tablas 11,12,13, 14, 15 y 16), independientemente de las bacterias utilizadas, el número de colonias fue de 0 colonias hasta colonias incontables, presentandose gran variabilidad en el número de colonias bacterianas entre la réplica realizada para cada muestra. Sin embargo en algunos casos existió una disminución del número de colonias, cuando fueron tratadas con plasma, revelando que el mismo podría tener propiedades microbicidas.

Esta observación se confirmó cuando se utilizó una concentración bacteriana de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml (tabla 17,18 y 19), el número de colonias entre la réplica presentó mayor homogeneidad, permitiendo de esta manera cuantificar una disminución de las UFC, en presencia de plasma.

**Tabla 11.** UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 1 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando CM para los *Vibrios* y LB para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS										
Muestra	<i>V. harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V. alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>		<i>M. luteus</i>	
Réplica	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
1	17	107	66	23	260	35	24	15	44	66
2	31	21	1	27	270	42	3	1	18	57
3	14	13	1	9	556	182	8	1	63	62
4	35	22	1	9	86	432	22	18	47	50
5	10	11	1	24	281	176	19	3	45	43
CB	58	66	1	13	421	176	32	21	36	74

I Incontables  
R Réplicas  
M Muestra

**Tabla 12:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 2 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando CM para los *Vibrios* y LB para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS									
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V.alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>		R
	M	R	M	R	M	R	M	R	
1	1	27	4	4	28	54	9	4	
2	12	48	9	1	101	22	28	9	
3	12	32	1	3	72	21	6	12	
4	19	12	5	7	52	30	11	5	
5	27	17	16	4	32	72	4	14	
CB	14	7	23	10	9	126	19	21	

I Incontables

R Réplicas

M Muestra

BIBLIOTECA  
FAC. DE  
MAREJADA

**Tabla 13:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 3 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando CM para los *Vibrios* y LB para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS									
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V.alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>		R
	M	R	M	R	M	R	M	R	
1	46	41	47	62	56	33	32	28	
2	130	152	2	7	100	64	56	25	
3	45	115	9	53	160	130	28	21	
4	38	45	1	4	105	90	14	25	
5	78	37	4	3	195	225	12	12	
CB	78	42	3	11	145	1	14	8	

I Incontables

R Réplicas

M Muestra

**Tabla 14:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 4 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando Agua de Peptona para los *Vibrios* y Pourros para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS										
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V.alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>		<i>M. luteus</i>	
	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R
1	74	110	112	138	235	285	3	2	175	87
2	102	183	113	209	240	236	35	13	203	219
3	175	128	81	150	127	44	8	18	130	102
4	137	109	58	81	157	214	12	6	78	64
5	140	71	40	140	294	208	10	61	121	112
CB	155	132	115	125	200	128	32	99	108	91

I Incontables  
R Réplicas  
M Muestra

**Tabla 15:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 5 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando Agua de Peptona para los *Vibrios* y Pourros para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS									
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V.alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>		
	M	R	M	R	M	R	M	R	
1	99	109	243	211	33	132	4	9	
2	225	307	257	222	110	352	2	8	
3	108	151	282	230	336	232	9	2	
4	144	287	237	213	90	168	1	1	
5	368	211	180	225	296	354	9	8	
CB	199	344	91	53	210	128	2	4	

I Incontables  
R Réplicas  
M Muestra



**Tabla 16:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 6 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando Agua de Peptona para los *Vibrios* y Pourros para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS									
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V. alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>		
Réplica	M	R	M	R	M	R	M	R	
1	21	41	4	41	205	115	8	39	
2	50	22	49	16	55	111	12	8	
3	23	16	3	16	21	0	3	42	
4	79	79	10	101	28	1	4	17	
5	68	49	21	28	38	149	15	27	
CB	104	74	30	79	162	1	6	5	

I Incontables

R Réplicas

M Muestra

**Tabla 17:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas a una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 7 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando CM para los *Vibrios* y LB para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS											
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V.alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>		<i>M. luteus</i>		
Réplica	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	
1	8	6	0	0	80	69	0	0	25	27	
2	8	5	1	2	34	45	2	2	15	17	
3	6	2	1	0	16	32	2	1	25	19	
4	3	9	3	1	9	50	0	1	29	34	
5	8	1	2	6	18	31	3	0	41	35	
CB	9	10	1	4	56	70	4	2	21	16	

I Incontables

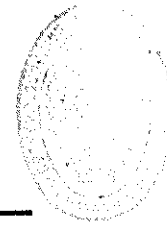
R Réplicas

M Muestra

**Tabla 18:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 8 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando CM para los *Vibrios* y LB para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS								
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V.alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>	
Réplica	M	R	M	R	M	R	M	R
1	4	7	1	0	3	2	1	3
2	9	13	2	1	5	3	4	1
3	6	8	0	0	2	8	3	2
4	7	5	3	4	3	1	4	3
5	6	9	6	9	7	6	5	7
CB	16	13	7	13	18	22	6	5

I Incontables  
R Réplicas  
M Muestra



BIBLIOTECA  
DEL INSTITUTO  
DE BACTERIOLOGIA

**Tabla 19:** UFC utilizando cinco cepas bacterianas una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml. Experimento 9 realizado simultáneamente al método turbidométrico utilizando CM para los *Vibrios* y LB para *E. coli* y *M. luteus*.

BACTERIAS								
Muestra	<i>V.harveyi</i>		<i>V. anguillarum</i>		<i>V.alginolyticus</i>		<i>E. coli</i>	
Réplica	M	R	M	R	M	R	M	R
1	3	4	1	2	13	2	9	6
2	10	14	2	4	8	5	7	5
3	10	7	1	1	2	3	4	6
4	17	9	0	3	3	2	4	5
5	16	9	4	3	8	9	7	9
CB	26	33	16	18	27	22	11	12

I Incontables  
R Réplicas  
M Muestra

Cabe indicar que este método permite detectar una sensibilidad de *V. harveyi* al plasma, sin embargo la disminución del número de colonias obtenidas con las UFC, no se acompaña de una disminución de la turbidez en el ensayo turbidométrico. Queda mucho por estudiar sobre las adaptaciones evolutivas de este *Vibrio* a su hospedador, sin embargo estos datos podrían indicar que las bacterias que no son eliminadas por los factores bactericidas del plasma prosperan y crecen "mejor" en un medio de cultivo conteniendo plasma.

Los resultados obtenidos indican que la variable más importante cuando se utilizó este método fue la concentración bacteriana, utilizando para pruebas posteriores  $13 \times 10^6$  bacterias/ml. A pesar de estos resultados, esta técnica presenta algunas desventajas, ya que implica utilizar una considerable cantidad de reactivos y tiempo para efectuar las diluciones previas a la siembra en agar, imposibilitando de esta forma analizar un gran número de muestras en rutina.

#### 3.1.4. Ensayos con indicadores de pH

Experiencias previas han demostrado que el plasma de los camarones puede producir melanina dificultando de esta forma la cuantificación de la actividad antibacteriana por el método turbidométrico. Este pigmento oscuro interfiere con la lectura realizada por el espectrofotómetro en los pozos de la microplaca cuando los animales han sido sometidos a un proceso de infección (ver antecedentes). A fin de sortear los inconvenientes provocados por la melanización, se utilizó indicadores de pH con la finalidad de encubrir la lectura de la melanina, minimizando el efecto colorimétrico de este pigmento.

Cabe indicar que el nivel de melanización de la hemolinfa de camarones no inducidos es mínimo o inexistente. Sin embargo era importante resolver este problema a fin de poder

cuantificar una posible estimulación de la respuesta antibacteriana mediante la inyección de bacterias en camarones.

Los indicadores de pH son sustancias químicas que indican mediante el viraje de color la presencia o ausencia de ácidos o bases en la solución a la cual son añadidos. Los más utilizados en los medios de cultivos bacterianos son el azul de bromotimol (cuyo intervalo de transición visual va del azul al amarillo) y el rojo de fenol (cuyo rango de coloración está entre el rojo y el amarillo).

A fin de enmascarar la melanina se modificaron los medios de cultivo añadiendo separadamente rojo de fenol y azul de bromotimol en los medios que se utilizaron en el protocolo turbidométrico optimizado. Para que estos indicadores de pH funcionen, fue necesario añadir carbohidratos en los medios de cultivo para que fueran asimilados por las bacterias produciendo invariablemente acidificación del medio y por ende el viraje del color, el mismo que sería detectado registrando la absorbancia a 540 nm para los medios que contengan rojo de fenol y 620 nm para los medios que contengan azul de bromotimol. Como tampón se utilizó el hepes a 20 mM para mantener el pH a 7,25.

La primera prueba se efectuó ensayando carbohidratos que produzcan acidificación de los medios de cultivo. Para lo cual se realizaron cinéticas del crecimiento bacteriano (sin plasma) con las cinco bacterias originalmente utilizadas, probando tres concentraciones de bacterias ( $67 \times 10^6$ ,  $40 \times 10^6$  y  $13 \times 10^6$  bacterias/ml) y simultáneamente cuatro modificaciones de los medios de cultivos (ver Anexo 2). Los medios de cultivo fueron los siguientes: caldo marino con glucosa más azul de bromotimol (CMGB), caldo marino con maltosa más azul de bromotimol (CMMB), caldo marino con glucosa más rojo de fenol (CMGR) y caldo marino con maltosa más rojo de fenol (CMMR), para el cultivo de los *Vibrios*. De igual forma se probaron glucosa y arabinosa en los medios para el cultivo de *E. coli* y *M. luteus*, siendo estos: LB con glucosa más azul de bromotimol (LBGB),

LB con arabinosa más azul de bromotimol (LBAB), LB con glucosa más rojo de fenol (LBGR) y LB con arabinosa más rojo de fenol (LBAR).

Independientemente del carbohidrato utilizado todos los *Vibrios* produjeron acidificación de los medios de cultivo. Es importante anotar que los dos azúcares, glucosa y maltosa, provocaron diferentes tonalidades de azul. Estas diferencias se tradujeron en diferentes absorbancias del medio (0,583 para CMGB y 0,348 para CMMB) indicando que la composición del medio influiría en la absorbancia, sin que exista una alteración previa del pH. El único carbohidrato que acidificó el medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* fue la arabinosa. Se descartó la utilización de la bacteria *M. luteus*, debido a que no se encontró ningún carbohidrato que fuera asimilado por esta bacteria y que produzca acidificación del medio.

De acuerdo a estos resultados se seleccionó a la glucosa y a la arabinosa para que formen parte de la composición de los medios para el cultivo de *Vibrios* y *E. coli*, respectivamente. Por otra parte las distintas concentraciones bacterianas no influyeron en el tiempo de acidificación de los carbohidratos, seleccionándose  $40 \times 10^6$  bacterias/ml, que fue la misma concentración utilizada en las pruebas de optimización del método turbidométrico. El tiempo aproximado de cambio de coloración de los medios de cultivo fueron de 6 horas para *V. anguillarum* y *E. coli*; y 3 horas para *V. harveyi* y *V. alginolyticus* tomándose como válidas las lecturas anteriores al viraje completo de color.

Posteriormente se realizaron pruebas para registrar las absorbancias de los medios de cultivo, en función del cambio de color. Se descartó inmediatamente los medios de cultivo que utilizaban el rojo de fenol, debido a que la turbidez producida por el crecimiento bacteriano interfirió con la cuantificación de la absorbancia del color del medio de cultivo, durante el viraje del color.

Los resultados de la cuantificación de la absorbancia de los medios de cultivo, que contenían azul de bromotimol en su composición (Tabla 20 y 21), indican que la variación

de ésta es mínima durante el lapso de acidificación del medio, si se la compara con el incremento de la absorbancia provocada por el crecimiento bacteriano en los medios de cultivo sin indicador.

**Tabla 20:** Viraje de color y variación de las absorbancias (620 nm) utilizando tres diferentes medios de cultivo (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas), sembradas con *V. anguillarum* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml

Medios de cultivo	TIEMPO(HORAS)		
	0	3	6
CM	0,043 $\pm$ 0,002	0,057 $\pm$ 0,003	0,116 $\pm$ 0,007
CMG	0,042 $\pm$ 0,005	0,059 $\pm$ 0,004	0,151 $\pm$ 0,012
CMGB	0,597 $\pm$ 0,010	0,586 $\pm$ 0,003	0,439 $\pm$ 0,013
Color	Azul	Verde	Amarillo

CM: Caldo Marino

CMG: Caldo Marino con glucosa

CMGB: Caldo Marino con glucosa más azul de bromotimol

**Tabla 21:** Viraje de color y variación de las absorbancias (620 nm) utilizando diferentes carbohidratos en los medios de cultivo (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas), sembradas con *V. harveyi* a una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml

Medios de cultivo	TIEMPO(HORAS)		
	0	3	6
CM	0,085 $\pm$ 0,004	0,217 $\pm$ 0,015	0,534 $\pm$ 0,010
CMGB	0,583 $\pm$ 0,013	0,353 $\pm$ 0,010	0,380 $\pm$ 0,003
Color	Azul	Verde	Amarillo

CM: Caldo Marino

CMGB: Caldo Marino con glucosa más azul de bromotimol.

CMMB: Caldo Marino con maltosa más azul de bromotimol.

A pesar de estos resultados, se realizaron ensayos para la cuantificación de la actividad antibacteriana utilizando Azul de Bromotimol, siendo uno de los principales inconvenientes la disminución de la absorbancia, la que se produjo al poner en contacto el medio de cultivo (CMGB) con el plasma (Tabla 22). En efecto, esta mezcla ocasionó un cambio de la coloración del medio, del azul al verde (sin alterar el pH), el mismo que provocó un desfase en la escala colorimétrica y por lo tanto en la absorbancia entre las muestras de plasma y las del control del crecimiento bacteriano, este desfase provocaría una incorrecta cuantificación de la capacidad antibacteriana del plasma.

**Tabla 22.** Variación de las absorbancias (620nm) al poner en contacto plasma con medio de cultivo (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas)

Medios de cultivo	TIEMPO	COLOR
	1	
CMGB sin plasma	0,633 $\pm$ 0,026	Azul
CMGB con plasma	0,327 $\pm$ 0,004	Verde

CMGB: Cuido Marino con glucosa más azul de bromotimol

La utilización de los indicadores de pH se abandonó debido a que el grado de variación de las absorbancias producida por la acidificación del medio era menor en comparación a las lecturas obtenidas por el crecimiento bacteriano sin el uso de los indicadores de pH y a las alteraciones colorimétricas provocadas por la composición de los medios y por la presencia de plasma.

### 3.2 ESTUDIO DE LA INDUCTIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN EL PLASMA DEL CAMARÓN *PENAEUS VANNAMEI*

En base a los resultados obtenidos con los tres ensayos se escogió el método turbidométrico para cuantificar la actividad antibacteriana de animales a los que se les inyectó bacterias, debido a que este método mostró los mejores resultados cuando se optimizó las condiciones experimentales, descartándose el método de las UFC; ya que es poco práctico y presentó grandes variaciones en el número de colonias bacterianas formadas y el método de ZI por que no permitió una determinación cuantitativa, de la respuesta antibacteriana.

La respuesta inmunitaria de los insectos contra heridas o infecciones microbianas se caracteriza por una rápida y temporal, síntesis y liberación de potentes péptidos antimicrobianos y antifúngicos. Existen muy pocos datos acerca de la inducción de la respuesta antibacteriana en crustáceos, sin embargo en algunas especies de interés comercial (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) se ha descrito un incremento en la protección contra infecciones provocadas por *Vibrios*, mediante la inyección de bacterias (Itami *et al.*, 1989; Adams, 1991).

Tomando en cuenta estos antecedentes se realizó una aplicación del ensayo turbidométrico para determinar una estimulación de la producción de moléculas antibacterianas en la hemolinfa de camarones *P. vannamei*, a los cuales se les inyectó bacterias vivas (*E. coli* y *M. luteus*) en el sistema circulatorio.

Se utilizaron camarones de 3 a 10 g obtenidos de la camaronera Fuentes, ubicada en la zona de Palmar, aclimatándolos durante 4 semanas aproximadamente en el CENAIM en tanques de 500 litros. Después del tiempo de aclimatación, tres grupos (cada grupo constituido por tres tanques, cada tanque contenía entre 15 y 20 animales) fueron inyectados con una mezcla de bacterias (ver materiales y métodos), mientras que al cuarto grupo llamado control (48 animales) no se les inyectó bacterias. La hemolinfa de los



animales del control fue recuperada a las 0 horas, mientras que para los tres grupos restantes (los que conformaban los tratamientos), la hemolinfa fue recuperada para cada uno de ellos a las 6, 12 horas y 24 horas después de la inyección de bacterias. Con las muestras de hemolinfa extraídas se realizó la cuantificación de la actividad antibacteriana utilizando el método turbidométrico.

Debido a que no se encontró una solución para enmascarar la melanización con los indicadores de pH, se llevó en la microplaca un control de melanización (igual al control plasma CP) para cada muestra de plasma. La absorbancia (producida por la melanina) obtenida a las 8 horas de incubación en los pozos del CP, es restada de la absorbancia obtenida de los pozos en los que se incubó plasma y bacterias, limitando así la influencia de este pigmento en la cuantificación de la actividad antibacteriana. Adicionalmente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro cada dos horas y a partir de la quinta hora del crecimiento bacteriano, se realizó una lectura cada hora.

Las pruebas efectuadas con el plasma de camarones no inyectados (control-tiempo 0 horas) demuestran una gran variabilidad de la actividad antibacteriana entre los individuos (Fig. 13, tabla 23). Esta variabilidad se produciría por las diferencias fenotípicas existentes entre los camarones, las cuales provocarían que los animales presenten respuestas diversas a las condiciones de cultivo o a un estímulo. Adicionalmente, la elevada actividad antibacteriana en los camarones no inyectados se produciría, ya sea porque la capacidad antibacteriana es de carácter constitutivo o porque la presencia de bacterias en el medio mantendría en constante estimulación a los animales.

Los resultados obtenidos con los animales inyectados indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el control y el grupo 6 horas, mientras que los grupos 12 y 24 horas no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con ninguno de los grupos anteriormente mencionados. Las pruebas realizadas con el plasma recuperado a las 6 horas indican una disminución del crecimiento bacteriano, sin embargo entre las 6 y 12 horas se produce un

incremento del crecimiento bacteriano indicando una disminución de la actividad antibacteriana, existiendo entre las 12 y 24 horas una tendencia al incremento de la capacidad antibacteriana.

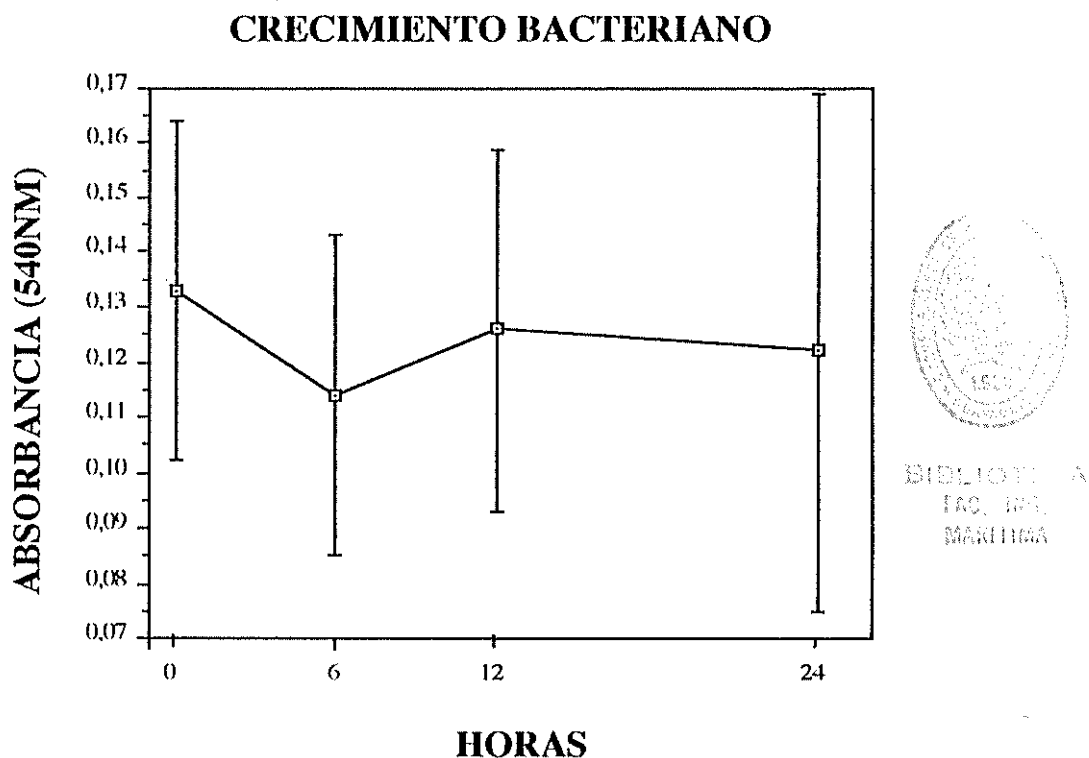
El incremento de la respuesta antibacteriana en el grupo 6 horas se debe probablemente a la liberación de factores antibacterianos almacenados en los hemocitos, los cuales serían liberados para combatir la infección. En efecto Chisholm y Smith (1992, 1995) han demostrado la presencia de una potente actividad antibacteriana en los hemocitos de otros crustáceos decápodos, sin embargo la actividad de estos factores serían de corta duración. La tendencia al incremento observado a las 24 horas podría ser consecuencia de la síntesis de nuevos factores antibacterianos (inducción) por acción de la inyección de bacterias.

**Tabla 23.** Distribución de frecuencias del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano a 0 (control), 6, 12 y 24 horas

Intervalos de clase	F	FA	F	FA	F	FA	F	FA
% de inhibición	Control		6 H		12 H		24 H	
9,50-24,50	6	6	1	1	4	4	5	5
24,51-39,50	9	15	6	7	12	16	7	12
39,51-54,50	20	35	13	20	15	31	11	23
54,51-69,50	13	48	21	41	13	44	15	38
69,51-84,50	0	48	1	42	1	45	5	43

F frecuencia

FA frecuencia acumulada



**Figura 13:** Concentración de *E. coli* después de la exposición al plasma de camarones inducidos por inyección de bacterias vivas. Las muestras de plasma fueron tomadas antes de la inyección (control-tiempo 0 horas) y a diferentes tiempos de post-inyección (tiempo 6, 12 y 24 horas)

### 3.3 APLICACIONES DEL ENSAYO ANTIBACTERIANO TURBIDOMETRICO (EAT)

#### 3.3.1. El EAT como herramienta para estudiar la respuesta inmunitaria contra *Vibrio harveyi*

*V. harveyi* es una bacteria presuntamente patógena, ella sería responsable del síndrome de "bolitas" y del síndrome de la zoea, enfermedades que provocan enormes mortalidades en los laboratorios de producción de larvas. En las pruebas realizadas con el fin de desarrollar el EAT se pudo observar que esta bacteria sería insensible a la actividad antibacteriana del plasma del camarón. Sin embargo el EAT optimizado, ha permitido

evaluar la respuesta antibacteriana de muestras individuales de camarones contra *V. harveyi*. Como se puede observar en la figura 14 y tabla 24, en un grupo de 9 muestras analizadas, 8 no tienen efecto contra este *Vibrio*, a excepción de la muestra 9 la cual sí ejerce una acción inhibitoria sobre el crecimiento de esta bacteria.

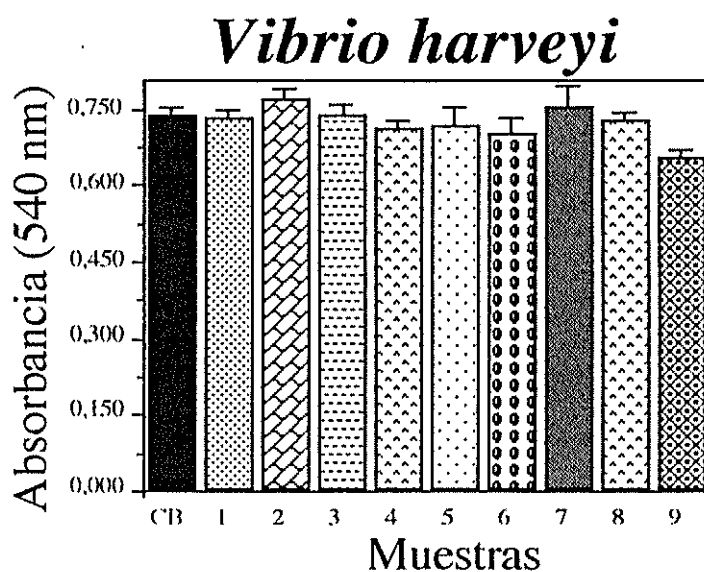
Los resultados de esta prueba muestran que el ensayo permitiría medir la capacidad de eliminación de bacterias patógenas, siendo esta bacteria una buena candidata para ser usada cuando se requiera hacer selección genética en base a la resistencia a infecciones.

**Tabla 24:** Cuantificación del crecimiento bacteriano <sup>a</sup> de 8 muestras de plasma contra la bacteria *Vibrio harveyi* (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición del crecimiento)

Muestra	Absorbancias	%
CB	0,735 $\pm$ 0,016	0
1	0,734 $\pm$ 0,007	0
2	0,771 $\pm$ 0,009	0
3	0,738 $\pm$ 0,016	0
4	0,713 $\pm$ 0,007	3
5	0,715 $\pm$ 0,035	3
6	0,700 $\pm$ 0,027	5
7	0,755 $\pm$ 0,032	0
8	0,728 $\pm$ 0,011	1
9	0,651 $\pm$ 0,013	11

<sup>a</sup> Diferencias entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB Control del crecimiento bacteriano



**Figura 14:** Crecimiento bacteriano de muestras individuales de plasma de camarones utilizando el EAT

### 3.3.2. EAT en la detección de características antibacterianas de proteínas plasmáticas

Durante los trabajos realizados sobre la purificación de péptidos antibacterianos a partir del plasma del camarón *P. vannamei* Bachère y colaboradores (comunicación personal), determinaron que una fracción prepurificada con potente actividad antibacteriana, poseía un péptido con una secuencia de aminoácidos igual al extremo C-terminal de la hemocianina.

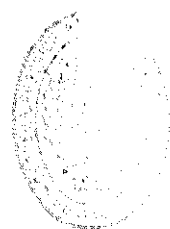
Adicionalmente experiencias propias al realizar ensayos antibacterianos (observación que se realizó sobre el color de las muestras de plasma) han mostrado que las muestras que tuvieron alto porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (>60%) presentaban un color fuertemente azul, mientras que las muestras que tenían bajo porcentaje de inhibición (<30%) presentaban un color muy pálido, indicando una posible relación entre el contenido proteico del plasma y la actividad antibacteriana. Los hechos antes

mencionados convierten a la hemocianina, proteína respiratoria mayoritaria de la hemolinfa, en una candidata interesante para evaluarla con el ensayo turbidométrico antibacteriano.

Se pudo obtener hemocianina purificada, enviada amablemente por la Dra. Gloria Yépez del laboratorio del CIAD (Hermosillo, México) y se realizó un primer ensayo turbidométrico sustituyendo los 10  $\mu$ l de plasma por 10  $\mu$ l de hemocianina purificada de *P. vannamei*. Se utilizaron tres concentraciones de hemocianina (5, 10 y 20 mg por pozo). Como control de crecimiento bacteriano se utilizó BSA (Albúmina de suero bovino) a las mismas concentraciones de la hemocianina. Todas las diluciones de la hemocianina y de la albúmina fueron utilizadas a una osmolaridad final de 800 mOsm y pH a 7,25 (iguales a las encontradas en la hemolinfa del *P. vannamei*). Los resultados de esta prueba (tabla 25) nos indican que a la mayor concentración de hemocianina utilizada hubo el 100% de inhibición del crecimiento de *E. coli*, mientras que a 5 y 10 mg/ml los porcentajes estuvieron dentro del 90% de inhibición del crecimiento de las bacterias.

**Tabla 25.** Cuantificación de crecimiento bacteriano <sup>a</sup> utilizando hemocianina de *P. vannamei* contra la bacteria *E. coli* (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición)

Dilución (mg/ml <sup>-1</sup> )	BACTERIA	
	<i>E. coli</i>	%
5	0,017 $\pm$ 0,006	92
10	0,005 $\pm$ 0,002	98
20	0,001 $\pm$ 0,009	100
CB	0,222 $\pm$ 0,003.....0	



CIAD  
Hermosillo  
Sonora  
México

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB: Control de crecimiento bacteriano

Estos resultados no dejan de ser sorprendentes considerando las propiedades fundamentalmente respiratorias de la hemocianina. Sin embargo con la finalidad de descartar la presencia en la muestra de proteína de algún reactivo bactericida o bacterioestático como el EDTA, se realizó una diálisis de la hemocianina de *P. vannamei* contra agua destilada (tamaño de la membrana 12,000 - 14,000 kDa, Spectrum). La proteína dializada fue liofilizada y resuspendida en una solución salina (800 mOsm, pH 7,5). Con esta muestra se realizó el EAT a concentraciones de 1-5 y 10 mg/ml con el mismo CB. Los resultados de este ensayo están ilustrados en la tabla 26.

Como se puede observar, la fuerte actividad antibacteriana detectada en la muestra de hemocianina purificada no es consecuencia de algún contaminante químico utilizado durante la purificación de la misma. Sin embargo no se puede descartar la presencia de algún péptido o proteína contaminante con actividad microbicida. Los datos disponibles no permiten afirmar o negar que la hemocianina de camarón posea propiedades antibacterianas, queda sin embargo como una vía de estudio interesante, por las implicaciones que esto tendría para la acuicultura de camarones profundizar conocimientos sobre esta proteína respiratoria.

**Tabla 26.** Cuantificación del crecimiento bacteriano utilizando hemocianina de *P. vannamei* contra la bacteria *Escherichia coli* (valor promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres réplicas y porcentaje de inhibición)

Dilución (mg/ml <sup>-1</sup> )	BACTERIA	
	E. coli	%
1	0,246 $\pm$ 0,002	0
5	0,120 $\pm$ 0,030	42
10	0,008 $\pm$ 0,005	96
CB	0,206 $\pm$ 0,007.....0	

<sup>a</sup> Diferencia entre las absorbancias del tiempo 8 y el tiempo 0

CB: Control de bacterias

## CONCLUSIONES

La prevención de enfermedades que atacan al camarón está relacionado con técnicas y ensayos para identificar precozmente inmuno-deficiencias y con el cultivo de cepas domesticadas y seleccionadas en base a la resistencia a infecciones. En el presente trabajo se desarrolló diversos ensayos destinados a detectar y cuantificar la actividad antibacteriana del plasma del camarón *Penaeus vannamei*.

El ensayo antibacteriano turbidométrico evidenció tener una mayor capacidad demostrativa cuando se utilizó una concentración de  $40 \times 10^6$  bacterias/ml.

Se seleccionó la bacteria *E. coli*, para realizar el EAT por que fue muy reproducible, revelándose muy susceptible a la actividad antibacteriana del plasma.

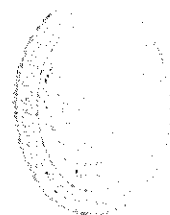
El ensayo de unidades formadoras de colonias UFC, demostró no ser el método más idóneo a utilizarse, debido a las dificultades que implicaba el protocolo. Este método presentó datos comparables a una concentración de  $13 \times 10^6$  bacterias/ml y permitió determinar que las propiedades antimicrobianas del plasma serían bactericidas.

El ensayo de zona de inhibición permitió detectar una alta capacidad bactericida constitutiva contra los tres *Vibrios* utilizados.

El ensayo de inducción de la actividad antibacteriana permitió demostrar que la respuesta antibacteriana del plasma sería constitutiva siendo alta tanto en animales no inducidos como en los estimulados, sin embargo la inyección de bacterias produciría una



estimulación, pero los resultados obtenidos no permiten definir si esta se produce por una activación total del sistema inmunitario (mecanismos inmediatos de defensa) o por la síntesis de factores antibacterianos como ocurre en los insectos.



BIBLIOTECA  
FAC. 199,  
MARIHMA

## RECOMENDACIONES

Aplicar el ensayo antibacteriano optimizado a fin de establecer correlaciones con los otros test de inmunoevaluación.

Aplicar este ensayo en estudio clínico para evaluar su calidad como marcador de la condición inmunitaria, de una parte en relación con el medio ambiente y de otra en relación con el polimorfismo genético de los camarones, como aplicación seleccionando animales con alta resistencia a enfermedades.

Aplicar este test para la purificación y caracterización de péptidos antibacterianos y de la caracterización de los genes, a fin de producir los péptidos por biotecnología y por otra parte utilizar o transferir estos genes a más largo plazo para la transformación genética del camarón.

Utilizar el ensayo antibacteriano para estudiar la respuesta inmunitaria contra patógenos como *V. harveyi* y adicionalmente utilizarlo para la selección de cepas resistentes a enfermedades.

A nivel inmuno aplicado si la actividad antibacteriana del plasma se revela como un buen inmuno-marcador este ensayo debe ser puesto al servicio del sector camaronero para identificar las variaciones de las respuestas de la capacidad antibacteriana entre grupos de animales, producto del stress o de su condición fisiológica.

A nivel de inmunestimulación utilizar este ensayo como herramienta para determinar las potenciales aplicaciones que tendría *Vibrio alginoliticus* (ILI), bacteria presuntamente probiótica, sobre los camarones en cultivo. La aplicación de esta bacteria a los camarones (Serrano, 1996; San Miguel, 1996, comunicación personal), protegería a los animales contra el ataque de una potencial cepa patógena *Vibrio harveyi* (E22). Esta protección

sería a nivel de competencia de colonización entre bacterias, sin embargo se podría utilizar el ensayo antibacteriano turbidométrico para estudiar una inmuno-estimulación humoral en juveniles colonizados por *V. alginoliticus* (LI) contra patógenos invasores.



BIBLIOTECA  
FAC. BIOL.  
MARACÁ

## BIBLIOGRAFIA:

ADAMS, 1991. Responde of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish and Shellfish Immunol., 1:59-70.

AKETAGAWA, J., MIYATA, T., OHTSUBO, S., NAKAMURA, T., HAYASHIDA, H., MIYATA, T. & IWANAGA, S. 1986. Primary structure of *Limulus* Anticoagulant Anti-lipopolysaccharide Factor. J. Biol. Chem, 261:7365-7375.

ANDERSONS, D., GUNNE, H., HELLERS, M., JOHANSSON, H. & STEINER, H. 1990. Immune responses in *Trichoplusia ni* challenged with bacteria or baculoviruses, Insect Biochem., Vol: 20, No.5:537-543.

BARONDES, S. H. 1981. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. Annual Review of Biochemistry, Vol. 50: 207-231.

BOMAN, H. G. & HULTMARK, D. 1987. Cell-free immunity in insects, Annu. Rev. Microbiol. 41, 103-126

CASTEELS, P. 1990. Possible applications of insect antibacterial peptides. In: Cellular and Molecular aspects of insect immunology, Res. Immunol. 1990, 141, 895-960.

COCIANCICH, S., BULET, P., HETRU, C. & HOFFMANN, J. A. 1994. The Inducible Antibacterial Peptides of Insects, Parasitology Today, Vol. 10, No. 4, 132-138

CHADWICK, J. S. & DUNPHY, G. B. 1986. Antibacterial and antiviral factors in arthropod hemolymph, In: Gupta AP, ed. Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods, New York, 1986, 287-330..

- CHISHOLM, J. R. & SMITH, V. J. 1982. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Marine Biological Assays UK*, 72:529-542.
- CHISHOLM, J. R. & SMITH, V. J. 1994. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. *Journal of Marine Biological Assays UK*, 74:979-982.
- CHISHOLM, J. R. & SMITH, V. J. 1995. Comparison of antibacterial activity in the haemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110 (1): 39-45.
- CHRISTENSEN, B. M. & NAPPI, A. J. 1988. Immune Responses of Arthropods, *Atlas of Science 0894-3761*, 15-19.
- DIMARCQ, J. L., KEPPI, E., DUNBAR, B., LAMBERT, J., REICHHART, J. M., HOFFMANN, D., RANÇINE, S. M., FOTHERGILL, J. E., & HOFFMANN, J. A. 1988. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino acid sequence of the predominant member, dipteracin A. *Europ. J. Biochem.*, 171, 17-22.
- DUNN, P. E., DAI, W., KANOST, M. R. & GENG, C. 1985. Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 9: 559-568.
- DURÉLL, S., RAGHUNATHAN, G. & GUY, R. 1992. Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophysical Society*, Vol: 63, 1623-1631.
- ENGSTRÖM, Y. 1992. Insect Immune System, In: Crampton, J. M. & Eggleston, P., ed. *Insect Molecular Science*, Academic Press, 1992, 125-137.

FAYNE, I. 1990. Acquired Immunity in insects: The Recognition of nonself and the subsequent onset of immune protein genes, *Res. Immunology*, No. 141, 895-960.

FUNAKOSHI, M., & AIZAWA, K. 1989. Antiviral substance in the silkworm gut juice against a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*, *Journal of Invertebrate Pathology* 53, 135-136.

GLASER, R. W. 1918. *Psyche*. 25, 38-46.

HAPNER, K. D. & STEBBINS, M. R. 1986. Biochemistry of arthropod agglutinins. In: Gupta AP, ed, 1986. *Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods*, New York, E.E.U.U., 227- 250.

HULTMARK, D., STEINER, H., RASMUSON, T. & BOMAN, H. G. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106: 7-16

ITAMI, T., TAKAHASHI, Y. & NAKAMURA, Y. 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *J. Aquatic Animal Health*, 1:238-242.

IWANAGA, S. 1993. The limulus clotting reaction, *Current Opinion in Immunology*, No. 5, 74-82.

KANOST, M. R., KAWOoya, J. K., LAW, J. H., RYAN, R. O., VAN HEUSDEN, M. C. & ZIEGLER, R. 1990. *Advanced Insect Physiology*, 22, 298-396.

KOPACEK, P., HALL, M. & SÖDERHALL, K. 1993, Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J., Biochem.*, 213:591-597.

- KUO, M. J. & ALEXANDER, M. 1967. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J. Bacteriol.* 94:624-629.
- METALNIKOW, S. 1920. *C. R. Soc. Biol. Paris* 83, 817-820.
- METCHNIKOFF, S. 1884. *Arch. für Path. Anat.* 96, 177-195.
- MIYATA, T., TOKUNAGA, F., YONEYA, T., YOSHIKAWA, K., IWAGANA, S., NIWA, M., TAKAO, T. & SHIMONISHI, Y. 1989. Antimicrobial Peptides, Isolated from Horseshoe Crab Hemocytes, Tachyplesin II and Polyphemusins I and II: Chemical Structures and Biological Activity, *J. Biochemical*, 106, 663-668.
- MORITA, T., OHTSUBO, S., NAKAMURA, T., TANAKA, S., IWANAGA, S., OHASHI, K., NIWA, M. 1985. Isolation and Biological activities of limulus anticoagulant (Anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS), *Journal of Biochemistry*, 97, 1611-1620.
- MUÑOZ, M. 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral
- MURAKAMI, T., NIWA, M., TOKUNAGA, F., MIYATA, T., & IWANAGA, S. 1991. Direct Virus Inactivation of Tachyplesin I and its Isopeptides from Horseshoe Crab Hemocytes, *Chemotherapy* 1991, 37, 327-334.
- MUTA, T., MIYATA, T., TOKUNAGA, F., NAKAMURA, T. & IWANAGA S. 1987. Primary structure of Anti-lipopolysaccharide Factor from American Horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *J Biochem.*, 101: 1321-1330.
- NAKAMURA, T., FURUNAKA, H., MIYATA, T., TOKUNAGA, F., MUTA, T. & IWANAGA, S. 1988. Tachyplesin, a Class of Antibacterial Peptide from the Hemocytes

of the Horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 263, No. 32, 16709-16713

NOGA, E. J., ENGEL, D., ARROLL, T., MCKENNA, S. & DAVIDIAN, M. 1994. Low serum antibacterial activity coincides with increased prevalence of shell disease in blue crabs *Callinectes sapidus*. Diseases of aquatic organisms, Vol. 19: 121-128.

OHTA, M., ITO, H., MASUDA, K., TANAKA, S., ARAKAWA, Y., WACHAROTAYANKUN, R., KATO, N. 1992. Mechanisms of antibacterial action of Tachypleusins and Polyphemusins, a Group of Antimicrobial Peptides Isolated from Horseshoe crab Hemocytes, Antimicrobial agents and Chemotherapy, Vol, 36, No.7, 1460-1465.

OKADA, M. & NATORI, S. 1985. Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. J. Biol. Chem. 260: 7174-7177.

PAILLOT, A 1920. C. R. Soc. Biol. Paris 83, 817-820.

POWNING, R. F. & DAVISON, W. J. 1976. Studies on insect bacteriolytic enzymes. Some physical and enzymatic properties of lysozyme from *Galleria mellonella*, Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 55: 221-228.

PRESCOTT, L., HARLEY, J. & KLEIN, D. 1993. Microbiology, Second Edition. WCB Publisher 259-284.

RATANAPO, S. & CHULAVATNATOL 1990. Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 97:515-520.



RENWRANTZ, L. 1983. Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defense reactions: the immuno-biological importance of carbohydrate-specific binding molecules. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 7:603-608.

RENWRANTZ, L. 1986. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symposium of the Zoological Society of London*, Vol. 56:81-93.

ROWLEY, A. F., BROOKMAN, J. L. & RATCLIFFE, N. A. 1990. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *J. Inverteb. Pathol*, 52:459-470.

SAINT LEGER R. J., COOPER, R. M. & CHARNELY, A. K. 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metharhizium anisopliae*. *J. Inverteb. Pathol.*, 52:459-470.

SHARON, N. & LIS, H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, Vol. 246:227-234.

SHERMAN, K. E. 1985. Multiple virus interactions, 735-753. In: K. Maramorosch and K. E. Sherman (eds.) *Viral Insecticides for Biological Control*, Academic Press, New York, E.E.U.U.

SÖDERHÄLL, K. & AJAXON, R. 1982. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces spp.* and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on crayfish. *J. Inverteb. Pathol.* 39:105-109.

SÖDERHÄLL, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of arthropods. A review. *Dev. Comp. Immunol.*, 6: 601-611.

SÖDERHÄLL, K. & SMITH, V. J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and comparative immunology*, Vol. 7: 229-239.

SÖDERHÄLL, K & SMITH, J. V. 1986. The prophenoloxidase activating system the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustacean. In: "Immunity in invertebrates", M. Bréhelin (ed.), Springer, Berlin 208-223.

SÖDERHÄLL, K. & CERENIUS, L. 1992. Crustacean Immunity, Annual Review of Fish Diseases, 3-23.

SUNG, H. H., YANG, Y. L., & SONG Y. L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation.

TANAKA, S., NAKAMURA, T., MORITA, T. & IWANAGA, S. 1982. Limulus Anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of limulus coagulation system, Biochemical and Biophysical research communications, Vol. 15, No. 2, 717-723.

TESHIMA, T., UEKI, Y., NAKAI, T., SHIBA, T. & KIKUCHI, M. 1986. Structure determination of lepidopteran, self-defense substance produced by silkworm. Tetrahedron 42:829-834.

VARGAS-ALBORES, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. Journal of Marine Biotechnology 3: 153-156.

YOUNG, S. Y., III & SCOTT, H. A. 1970. Immunoelectrophoresis of hemolymph of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection, Journal of Invertebrate Pathology 29, 297-303.



ANEXO I

CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE PEPTIDOS INDUCIBLES ANTIBACTERIANOS DE INSECTOS Y DE ALGUNOS PEPTIDOS ANTIBACTERIALES DE VERTEBRADOS (Tomado de Muñoz, 1996).

NOMBRE	Tamaño (kDa)	Eucariotas, Procarionotas y virus	Modo de acción	Estructura tridimensional	Organismos donde se encuentran
<b>Cecropinas</b>					
Cecropinas de insectos	4	Gram + y Gram -	Bactericida, formación de poros iónicos en la membrana	Dos hélices a separados C-terminal aminado	Lepidoptera Dipteros
Cecropinas en mamíferos	4	Gram + y Gram -			
<b>Defensinas</b>					
Defensinas de insectos	4-5	Gram +	Bactericida, posee gran afinidad con fosfolípidos membranares	Bucle terminal Hélice a central Hoja b, 3 puentes intramoleculares disulfuro.	Dipteros Hymenopteros Coleopteros Odonata
<b>Péptidos ricos en Prolina</b>					
Apidaecinas	2	Gram -	Bacteriostático		Diptera Hymenoptera
Abaecinas	4	Gram + y Gram -	Bactericida		Hemiptera

**CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE PEPTIDOS INDUCIBLES ANTIBACTERIANOS DE INSECTOS Y DE ALGUNOS PEPTIDOS ANTIBACTERIALES DE VERTEBRADOS**

<b>NOMBRE</b>	<b>Tamaño (kDa)</b>	<b>Eucariotas, Procariontas y virus</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Estructura tridimensional</b>	<b>Organismos donde se encuentran</b>
Drosocinas	2,5	Gram -	Bactericida	Sustitución O-glycosilada	
Bactenecina	1,5	Gram + y Gram -	Bactericida, activa en la membrana citoplasmática	Un puente disulfuro, estructura antiparalela	
Bac5 y Bac7	5-7	Gram - y virus	Bactericida o bacteriostática permeabiliza la membrana interna y externa e inhibe el cambio respiratorio.		
PR 39	4,7	Gram + y Gram -			
<b>Péptidos ricos en glicina</b>					
Atacinas	20	Gram -	Bacteriostático, activo en la membrana externa		Lepidopteros Dipteros Coleopteros
Diptericinas	9	Gram -	Bactericida. A nivel de la membrana citoplasmática	C-terminal aminado dominante rico en glicina N-terminal dominante rico en prolina O-glycolisado	

**CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE PEPTIDOS INDUCIBLES ANTIBACTERIANOS DE INSECTOS Y DE ALGUNOS PEPTIDOS ANTIBACTERIALES DE VERTEBRADOS**

<b>NOMBRE</b>	<b>Tamaño (kDa)</b>	<b>Eucariotas, Procariontas y virus</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Estructura tridimensional</b>	<b>Organismos donde se encuentran</b>
Coleopterinas	8	Gram -	Bactericida	Dominio N-terminal	
Sarcotoxinas II	24	Gram -	Bactericida	C-terminal aminado rico en glicina N-terminal pyroglutamato	
Hymenoptaécinas	10	Gram + y Gram -	Bactericida		
Taquiplesinas		Gram - y Gram +		Hoja b antiparalela Dos puentes disulfuros	Limulus
Polifemusinas					



## ANEXO II

### **Caldo Marino con glucosa más azul de bromotimol CMGB (50 ml)**

Caldo Marino 1,87 g

Glucosa 0,25 g

Azul de Bromotimol 0,0013 g

pH: 7,2

### **Caldo Marino con glucosa más rojo de fenol CMGR (50 ml)**

Caldo Marino 1,87 g

Glucosa 0,25 g

Rojo de Fenol 0,0009 g

pH: 7,2

### **Caldo Marino con maltosa más azul de bromotimol CMGB (50 ml)**

Caldo Marino 1,87 g

Maltosa 0,5 g

Azul de Bromotimol 0,0013 g

pH: 7,2

### **Caldo Marino con maltosa más rojo de fenol CMMB (50 ml)**

Caldo Marino 1,87 g

Maltosa 0,5 g

Rojo de Fenol 0,0013 g

pH: 7,2

**Luria Bertani con glucosa más azul de bromotimol LBGB (50 ml)**

Extracto de levadura 0,25 g

Bactotryptona 0,5 g

Cloruro de Sodio 0,5 g

Glucosa 0,25 g

Azul de Bromotimol 0,0013 g

pH: 7,2

**Luria Bertani con glucosa más rojo de fenol LBGR (50 ml)**

Extracto de levadura 0,25 g

Bactotryptona 0,5 g

Cloruro de Sodio 0,5 g

Glucosa 0,25 g

Rojo de Fenol 0,0009 g

pH: 7,2

**Luria Bertani con maltosa más azul de bromotimol LBMB (50 ml)**

Extracto de levadura 0,25 g

Bactotryptona 0,5 g

Cloruro de Sodio 0,5 g

Maltosa 0,5 g

Azul de Bromotimol 0,0013 g

pH: 7,2

**Luria Bertani con glucosa más rojo de fenol LBGR (50 ml)**

Extracto de levadura 0,25 g

Bactotryptona 0,5 g

Cloruro de Sodio 0,5 g

Glucosa 0,25 g

Rojo de Fenol 0,0009 g

pH: 7,2



Elaborado en  
1981  
RODRIGUEZ