



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Estudio exploratorio de la presencia de actividad antibacteriana
en la sangre de la concha prieta *Anadara similis* “

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO ACUICULTOR

Presentada por:

Alberto Narciso Fernández Sigcho

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2008

AGRADECIMIENTO

A Dios, nuestro Padre celestial quien es la razón de todo, el principio y el fin.

A mis Padres, Alberto y Susana quienes me dieron la vida y a través de ella me supieron querer, guiar y apoyar en todo momento.

A mis hermanas, Lizzette, Katusca y Jacinta, porque de una u otra forma siempre están ahí cuando las necesito.

Al Ph.D. Marcelo Muñoz, por la dirección de mi tesis, su ayuda de principio a fin, por ser un excelente profesor y amigo porque a lo largo de todo este tiempo nunca faltó la “alegría” en el trabajo.

Al Decano de la FIMCM, Ing. Enrique Sánchez, al Sub. Decano M.Sc. Jerry Landivar y al Coordinador General M.Sc. Ecuador Marcillo, por las facilidades prestadas para la realización de esta tesis.

A todos los profesores que a lo largo de todos estos años de estudio me fueron formando como profesional y tomar de cada uno de ellos ciertos detalles para mi formación como persona.

Al CENAIM, por su colaboración, para realizar los gradientes isopícnicos y la donación de cepas bacterianas.

Al CSA y a su personal, por prestar sus instalaciones para la realización de algunos ensayos de este trabajo y la donación de cepas para el presente estudio.

Al CICYT y a la FIMCM, por el cofinanciamiento de este estudio.

DEDICATORIA

A mis padres:

Alberto y Susana

A mis hermanas:

Lizzette, Katusca y Jacinta

“Una casa será fuerte e indestructible cuando esté sostenida por estas cuatro columnas: padre valiente, madre prudente, hijo obediente, hermano complaciente”.

Confucio

TRIBUNAL DE GRADUACION

Jerry Landivar Zambrano M.Sc.

PRESIDENTE

Marcelo Muñoz Naranjo Ph.D.

DIRECTOR DE TESIS

Ecuador Marcillo Gallino M.Sc.

VOCAL

Paola Calle Delgado Ph.D.

VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

Alberto Narciso Fernández Sigcho

RESUMEN

El presente trabajo describe la presencia de células circulantes en la sangre de la concha prieta y la determinación de actividad antibacteriana en lisados de estas células circulantes. Los análisis realizados por tinción de estas células y en observaciones al microscopio, demostraron que estas células poseen núcleo y abundantes estructuras celulares de color café amarillento que tienen un parecido a gránulos esparcidos alrededor de todo el citoplasma. El presente estudio demuestra la presencia de actividad antibacteriana en los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra tres cepas bacterianas tipificadas como *Bacillus sp* (2), *Vibrio harveyi* y *Vibrio anguillarum*. Este trabajo no descarta que otras células que no sean las células circulantes de la concha prieta posean actividad antibacteriana. El presente trabajo es el primer estudio realizado para intentar determinar la presencia de actividad antibacteriana a nuestro conocimiento en la concha prieta y por lo tanto la primera descripción de esta actividad en este molusco.

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	VII
INDICE GENERAL	VIII
INDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE TABLAS	XI
INDICE DE GRÁFICOS	XII
INDICE DE ANEXOS.....	XV
INTRODUCCIÓN	XVII
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	1
1.1 Hábitat.....	2
1.2 Anatomía	2
1.3 Hemocitos y células circulantes en los moluscos	10
1.4 Respuestas inmunes celulares innatas en los moluscos	12
1.5 Factores Humorales	14
CAPÍTULO 2	
2. MATERIALES Y METODOS	16
2.1 Material biológico	16

2.1.1. Conchas	16
2.1.2. Bacterias	18
2.2 Separación de células	18
2.3 Frotis y Tinción	20
2.4 Domesticación de cepas bacterianas	20
2.5 Ensayos de actividad antibacteriana por halos de inhibición.....	22
2.6 Ensayo turbidométrico	25
2.7 Análisis estadístico.....	28

CAPÍTULO 3

RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	64
RECOMENDACIONES.....	66

ANEXOS

Bibliografía

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Concha prieta <i>Anadara similis</i>	1
Figura 1.2 Características internas y externas de las valvas de una concha...	3
Figura 1.3 Anatomía del tejido blando interno.....	5
Figura 2.1 Diagrama de protocolo para la de obtención muestras de plasma y células circulantes de concha prieta.....	17
Figura 2.2 Diagrama de método de halo de inhibición utilizado para la detección de actividades antibacterianas.....	24
Figura 3.1 Foto de células circulantes de la concha prieta, aumento de mil veces.....	30
Figura 3.2 Foto de células circulantes de la concha prieta, aumento de mil veces.....	31
Figura 3.3 Diferenciación de células circulantes de la concha prieta de acuerdo a su densidad, obtenido por gradiente discontinuo de Percoll....	32

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Valores determinados experimentalmente del número de células por ml. de cada una de las diferentes cepas de estudio correspondientes a una densidad óptica de 1 obtenidas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm.....	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de <i>Bacillus sp 1</i> con una sustancia de prueba.....	40
Gráfico 2 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa <i>Bacillus sp 1</i> luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.....	41
Gráfico 3 Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de <i>Bacillus sp 2</i> con una sustancia de prueba.....	42
Gráfico 4 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la <i>Bacillus sp. 2</i> luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.....	43
Gráfico 5 Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de <i>Bacillus sp 3</i> con una sustancia de prueba.....	44

Gráfico 6 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa <i>Bacillus sp.3</i> luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.....	45
Gráfico 7 Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de <i>V. alginolyticus</i> con una sustancia de prueba.....	46
Gráfico 8 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa <i>V. alginolyticus</i> luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.....	47
Gráfico 9 Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de <i>V. harveyi</i> con una sustancia de prueba.....	51
Gráfico 10 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa <i>V. harveyi</i> luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.....	52
Gráfico 11 Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de <i>V. vulnificus</i> con una sustancia de prueba.....	53
Gráfico 12 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa <i>V. vulnificus</i> luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.....	54

Gráfico 13 Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de <i>V. anguillarum</i> con una sustancia de prueba.....	55
Gráfico 14 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa <i>V. anguillarum</i> luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.....	56

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *BACILLUS SP 1* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

ANEXO B: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *BACILLUS SP 2* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

ANEXO C: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *BACILLUS SP 3* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

ANEXO D: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. ALGINOLYTICUS* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

ANEXO E: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. HARVEYI* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

ANEXO F: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. VULNIFICUS* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

ANEXO G: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. ANGUILLARUM* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

INTRODUCCIÓN

En general, los invertebrados carecen de memoria inmunológica, esta carencia se esta limitada por la incapacidad de los invertebrados de producir inmunoglobulinas (Locker *et al*, 2004). Sin embargo, los invertebrados poseen mecanismos de defensa rudimentarios pero muy eficientes, así en artrópodos y moluscos han sido puesto en evidencia diversos factores asociados con la respuesta inmune de estos organismos (Bachère *et al*, 2004). Estos factores inmunes se asocian con reacciones celulares y moléculas disueltas en la hemolinfa o sangre de los invertebrados. Estos componentes son sintetizados por distintos tejidos del cuerpo para luego ser liberados en la hemolinfa o en forma focal, en respuesta a un estímulo infeccioso (Bachère *et al*, 2004 y Yakovleva *et al*, 2001).

En especies comerciales, como la ostra y el mejillón, algunos estudios a profundidad han evidenciado una respuesta inmune, la cual se encuentra definida por la presencia de ciertos componentes inmunes, algunos de los cuales han sido caracterizados. En el caso del mejillón han sido identificadas proteínas de bajo peso molecular denominadas péptidos que presentan una

actividad antimicrobiana (Mita *et al*, 2000 a, Mita *et al* 2000 b). En las ostras, también algunos probables efectores de la respuesta inmune han sido determinados, gracias al uso de la tecnología de las secuencias de expresión marcadas llamadas EST (Bachère *et al*, 2004).

En otros moluscos de menor importancia comercial, como es el caso de la *Anadara similis*, concha prieta, poco se conoce acerca de las propiedades inmunes de estos individuos. Sin embargo, en organismos filogenéticamente relacionados a esta especie como es el caso de *Anadara granosa*, existen estudios que determinan la presencia de de ciertas moléculas tipo lectina presentes en este molusco (Yakovleva *et al*, 2001). Este hecho fundamenta que organismos del género *Anadara*, posean también otros efectores de inmunes aún no descritos. Así, este estudio es una primera aproximación para determinar otros factores asociados a la respuesta inmune a partir de particularidades morfológicas y funcionales de la concha prieta.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

Los bivalvos pertenecen al filo Mollusca. El filo de los moluscos tiene seis clases, una de las cuales es la de los bivalvos. Estos animales están comprimidos lateralmente y las partes blandas del cuerpo están completa o parcialmente recubiertas por la concha, que está formada por dos valvas unidas por una charnela. Las branquias de los animales de esta clase son órganos bien desarrollados y especializados para la alimentación, así como para la respiración. (<http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm>)

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Arcidae

Género: *Anadara*

Especie: *Similis*



FIGURA 1.1. Concha prieta *Anadara similis*

1.1 Habitación

La mayoría de los bivalvos se encuentran en aguas marinas costeras poco profundas sobre fondos fangosos y arenosos aunque pueden cambiar de hábitat según la estación. Pueden hallarse parcialmente enterradas en la arena o en el barro, escondidas entre las rocas con las valvas ligeramente abiertas y algunas especies viven fijas a sustratos mediante unas bridas muy finas o filamentos resistentes, que en conjunto se llama biso. Se han encontrado a profundidades desde 1m. hasta 50m. de profundidad, pero lo más común es encontrarlas entre 1m. y 3m. (<http://www.educared.net/concurso/254/bivalvos.htm> et al)

Las zonas donde se ha identificado la presencia de *Anadara sp.* comprenden Indo-Pacífico, Texas, Estados Unidos y Brasil. (Conservation of Biodiversity, Marine Park Establishment & Eco-tourism et al). En Ecuador se las puede encontrar a lo largo de todo el perfil costanero, las principales áreas de extracción de la especie *Anadara similis* han sido registradas en Hualtaco como la densidad mas alta y en El Morro como la densidad mas baja. (Instituto Nacional de Pesca – Ecuador et al, 2007)

1.2 Anatomía

Anatomía externa: Los bivalvos tienen dos valvas simétricas de concha gruesa con forma algo ovalada formadas de carbonato de calcio. La concha

tiene tres capas; interna o nacarada, intermedia o brillante y la capa externa o periostraco, con costillas radiales. Esto constituye un sólido esqueleto externo que protege al cuerpo, las impresiones existentes en la superficie interna de las valvas corresponden a las inserciones musculares. La zona de unión de las valvas o charnela se encuentra provista de numerosos dientes transversales. En cuanto a la locomoción y el enterramiento los bivalvos presentan el pie, el cual es un órgano musculoso distensible.

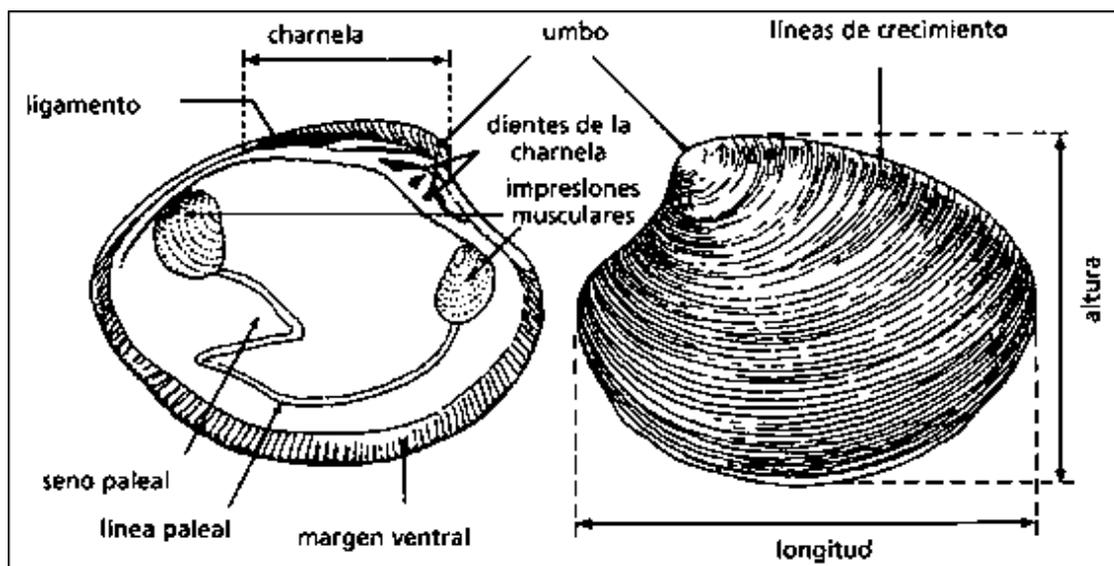


FIGURA 1.2. Características internas y externas de las valvas de una concha

Tomada de <http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm>

Anatomía interna: La constitución interna de los bivalvos consta de inserciones musculares, así estos presentan dos grandes músculos como son el abductor anterior y posterior, ambos transversales, que juntan las valvas. Además presentan también los músculos retractores anterior y posterior, los cuales retraen el pie dentro de la concha. Otro músculo presente en los bivalvos es el protractor anterior que contribuye en la extensión del pie.

(<http://www.biologiamarina.com/dev/projects/read.asp?pid=10&docid=49> et al.)

Manto: El manto recubre las partes blandas del bivalvo. Las dos mitades del manto están unidas a la concha por la charnela en posición ventral respecto de la línea paleal, pero sueltas en los bordes. Los bordes engrosados de los filamentos del manto pueden o no estar pigmentados y tienen tres pliegues. La función principal del manto es segregar la concha pero también cumple otros propósitos, ya que posee una función sensorial y puede iniciar el cierre de las valvas como respuesta a condiciones desfavorables en el entorno. También puede controlar la entrada de agua en la cavidad corporal, el movimiento del animal cuando nada y además tiene función respiratoria. (<http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm> et al)

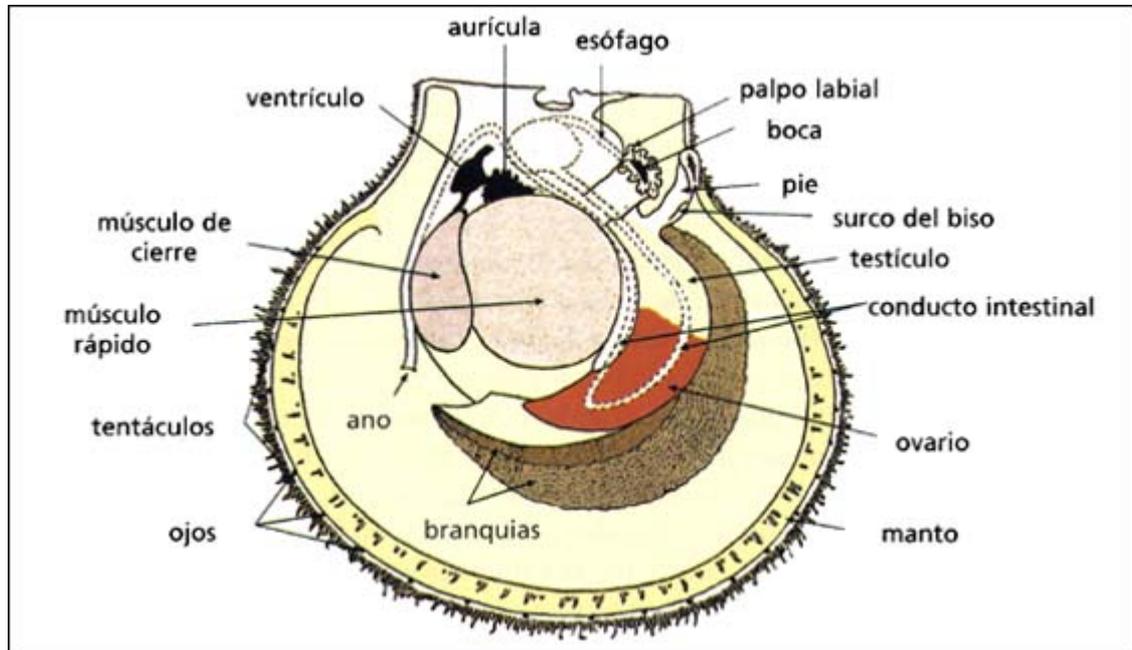


FIGURA 1.3. Anatomía del tejido blando interno

Tomada de <http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm>

Músculo aductor: Al retirar el manto se pueden ver las partes blandas del cuerpo, los músculos aductores. Los músculos cierran las valvas y actúan contra el ligamento y resilio, que activan el mecanismo de apertura de las valvas cuando el músculo se relaja. Tiene dos divisiones, la gran porción anterior (estriada) del músculo se denomina “músculo rápido” y se contrae para cerrar las valvas. La porción más pequeña (lisa) es conocida como “músculo de cierre”. (<http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm> et al).

Branquias: Son órganos grandes en forma de hoja que se utilizan en parte para la respiración y en parte para filtrar el alimento del agua. Hay dos pares de branquias colocados a ambos lados del cuerpo. En el extremo anterior, hay dos pares de lenguas, llamados palpos labiales, que rodean la boca y facilitan la introducción de alimentos.

Pie: El pie se encuentra en la base de la masa visceral. Es utilizado para excavar en el sustrato, sujetarse y también se utiliza para locomoción. En la parte central del pie hay una abertura desde la glándula bisal a través de la cual el animal segrega una sustancia filamentosa y elástica llamada «biso» con la que se puede adherir al sustrato.

(<http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm> et al.)

Sistema digestivo: Las grandes branquias filtran el alimento del agua y lo dirigen hacia los palpos labiales donde se clasifica antes de pasar a la boca. Los bivalvos tienen la capacidad de seleccionar alimentos filtrados del agua. El bolo alimenticio, amalgamado por el moco, pasa a la boca y a veces es rechazado por los palpos y eliminado por el animal en forma de las denominadas «pseudoheces». También disponen de un esófago corto que une la boca y el estómago, un saco hueco con cámaras y varias aberturas. El estómago se halla totalmente rodeado por el divertículo digestivo (glándula), una oscura masa de tejido que muchas veces se denomina «hígado». Dentro

del estómago hay una abertura que llega hasta un intestino muy curvo, para terminar en el recto y finalmente en el ano.

Sistema circulatorio: El sistema circulatorio es simple y bastante difícil de localizar. El corazón se halla en un saco transparente, el pericardio que se encuentra cerca del músculo aductor. El corazón tiene dos aurículas de forma irregular y un ventrículo. La aorta anterior y posterior sale del ventrículo y llevan la sangre a todo el cuerpo. El sistema venoso consta de una serie vaga de senos de pared fina a través de los cuales vuelve la sangre al corazón.

Transporte interno e intercambio gaseoso: En la mayor parte de los bivalvos, el ventrículo del corazón se ha plegado alrededor del intestino (recto), de modo que la cavidad pericárdica no solo encierra el corazón, sino un corto tramo del aparato digestivo.

Los bivalvos también exhiben el sistema circulatorio abierto típico de los moluscos, -corazón, senos tisulares, nefridios, branquias, corazón- aunque en ciertas especies han ocurrido ciertas modificaciones en este circuito. En todos los bivalvos hay una ruta circulatoria más o menos definida a través del manto, que es otro sitio donde ocurre intercambio gaseoso.

Según la especie, la sangre puede retornar del manto o de los riñones directamente al corazón.

El intercambio gaseoso ocurre mientras el agua corre dorsalmente entre las branquias. La cantidad de oxígeno extraído del agua es baja en comparación con la de otros moluscos. Esta baja absorción de oxígeno se relaciona con el enorme tamaño de la branquia, que es mucho mayor de lo que el animal necesita para respirar pero adecuado para alimentarse por filtración. La sangre de casi todos los bivalvos carece de pigmentos respiratorios. (Robert D. Barnes, Fisiología de los Invertebrados 5ta edición 1989)

Sistema urogenital: Los sexos de los bivalvos suelen estar separados (dioicos) o ser hermafroditas (monoicos). La gónada puede estar visible y ser un órgano bien definido u ocupar una porción importante de la masa visceral. En las ostras la gónada sólo es visible durante la estación reproductora cuando llega a ocupar hasta el 50% del volumen del cuerpo. En algunas especies los sexos se pueden distinguir cuando la gónada está llena, por el color de la gónada o examinando la gónada al microscopio. También se puede observar un pequeño grado de hermafroditismo en las especies dioicas. (<http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm> et al.)

Es posible que exista protandria e inversión de sexos en los bivalvos. En algunas especies se observa una preponderancia de machos en los animales más pequeños, lo que indica que el desarrollo sexual de los machos ocurre antes que el de las hembras o que algunos animales crecen como machos primero y luego cambian a hembras cuando son más grandes. En algunas especies, por ejemplo la ostra europea, *Ostrea edulis*, el animal puede desovar primero como macho en un ciclo, rellenar la gónada con óvulos y desovar una segunda vez como hembra.

El sistema renal es difícil de observar en algunos bivalvos, tienen dos riñones pequeños, de color pardo y en forma de saco, apretados contra la parte anterior del músculo aductor. Los riñones vacían en la cavidad paleal a través de grandes hendiduras. Los óvulos y esperma de las gónadas son expulsados a través de los conductos hacia la luz del riñón y luego pasan a la cavidad paleal. (<http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm> et al.)

Crecimiento y longevidad:

Las tasas de crecimiento y la longevidad de los bivalvos son muy variables. En general la mayor parte de los bivalvos crecen con la máxima rapidez durante sus primeros años de vida. Se sabe de individuos con edades de 20 a 30 años y, en ciertas especies, se han encontrado ejemplares de 150 años de edad.

Las tasas de crecimiento de las especies de valor comercial se conocen a la perfección. (Robert D. Barnes, Fisiología de los Invertebrados 5ta edición 1989)

1.3 Hemocitos y células circulantes en los moluscos

Los moluscos bivalvos tienen el sistema circulatorio abierto que es usado para la circulación de nutrientes y hormonas a través de las células sanguíneas para la distribución alrededor del cuerpo. (Bachère et al, 2004)

La hemolinfa de los bivalvos no tiene la capacidad de coagularse, pero los hemocitos muestran una llamativa y espontánea propiedad de agregación, resultando en la formación de coágulo. Los bivalvos carecen de una proteína respiratoria, y el oxígeno es disuelto y transportado a través de la hemolinfa. En moluscos, la cavidad pericardial es un sitio de filtración y excreción tan bueno como la nefridia, y las células cafeceras. Estas células están en contacto con los senos hemolinfáticos y la línea del epitelio pericardial.

Morfológicamente, la circulación celular granular y agranular son observadas en espacios vasculares. Los hemocitos no son únicamente envueltos en una reacción de defensa. Ellos pueden participar en la reparación de heridas y de la concha, transportación de nutrientes y

digestión, y en procesos de excreción. Los hemocitos son envueltos en una reabsorción gonadal por fagocitosis residual de gametos después de los periodos de desove. Esto ha sido establecido por muchos años que, como células inmunocompetitivas, los hemocitos de los bivalvos son capaces del reconocimiento de partículas extranjeras a través de lectinas y quimiotactismo, y muchos de ellos son células fagocíticas activas. (Bachère et al, 2004)

Las fagocitosis de los bivalvos son equipadas con sistemas de eliminación de agentes extranjeros oxidativos y no oxidativos, siendo los no oxidativos relacionados con lisozimas. La clasificación de la población de hemocitos o tipos de células en los moluscos bivalvos han sido sujeto de extensos estudios por muchos años. Varios criterios han sido considerados: morfología, ultraestructura, características físico-químicas, separación de la población celular y actividades y biológicas funcionales.

En lo que concierne a la clasificación realizada en 1999 por Hine tal cual como está citada por Bachère et al, 2004 describe la presencia de diversos grupos de células. En resumen, una población granular podría ser compuesta de gránulos basófilos y eosinófilos con actividad fagocítica. Residuos de materiales fagocitados son a menudo observados en estas células. Tres tipos de hemocitos no granulados son también identificados, caracterizados por la ausencia o la presencia de pocos gránulos citoplasmáticos. Células

explosivas presentando alto radio de núcleo citoplasmático y libre de ribosomas podrían ser células precursoras; grandes basófilos en los hemocitos no granulares son distinguidos de células parecidas a macrófagos consideradas como hialinocitos con un color menor del citoplasma hialino. (Bachère et al, 2004)

De acuerdo a esta maduración y actividad, ellos pueden envolver de células jóvenes con una gran relación núcleo-citoplasma una gran cantidad de hemocitos con un núcleo pequeño y un citoplasma rico en vesículas.

No existe una clasificación satisfactoria hasta el día de hoy. Además, el proceso de hematopoyesis en bivalvos es desconocido. Se cree que lo mas generalmente aceptado es que los hemocitos se pueden originar de células del tejido conectivo. (Bachère et al, 2004)

1.4 Respuestas inmunes celulares innatas en los moluscos

Dentro de las respuestas inmunes celulares de los moluscos encontramos la fagocitosis y otros eventos ligados a ella como el choque respiratorio dentro de varios procesos sucesivos. (Bachère 1995.)

La quimiotaxis, la cual es pobremente conocida en bivalvos.

El reconocimiento, el cual es mantenido por medio de moléculas de membrana y secretadas.

Internalización de partículas extranjeras en una estructura primaria llamada fagosoma, la cual se fusiona con los lisosomas, en donde estos descargan sus enzimas lisosomales, la cuales son de vital importancia en la destrucción de los microorganismos.

Existen además otras reacciones en el proceso de fagocitosis de microorganismos que entran en acción contra ellos como lo es el mecanismo del asesinato oxidativo. En moluscos existen evidencias de que este mecanismo de asesinato oxidativo se encuentra presente como se encuentra discutido en (Bachère et al 1995).

Otros mecanismos de defensa de moluscos han sido puestos en evidencia como lo son la utilización de péptidos antimicrobianos para contrarrestar el efecto de agentes microbianos invasores. Principalmente en el mejillón podemos encontrar una batería poderosa de péptidos antimicrobianos los cuales presentan diferencias en cuanto a su localización luego de estímulos antimicrobianos (Mitta et al, 2000 b). Así, podemos encontrar dentro de esos peptidos antimicrobianos de mejillón la Mytilins

(Mitta et al, 2000 a). Myticins (Mitta et al, 1999), Defensinas de mejillón (Mitta et al, 2000 a).

Además, en la ostra *Cassostrea gigas* recientemente también se han detectado 2 isoformas de defensinas, las cuales muy probablemente se encuentran relacionadas con la respuesta innata de estos moluscos (González et al, 2006). Cabe destacar así mismo, que en la ostra americana *Cassostrea virginica* se ha puesto en evidencia la presencia de otra defensina propia de esta especie (Seo et al, 2005).

1.5 Factores Humorales

Interacción entre factores humorales, hemocitos y células claves, que resultan en fagocitosis o encapsulación de materiales extraños, juega un rol clave en la reabsorción de células extrañas y tejidos desconocidos. La mayoría de los factores solubles envueltos en reacciones de defensa son plasma (células libres de hemolinfa) glicoproteínas que son capaces de aglomerar partículas extranjeras después de su penetración en el organismo de los moluscos.

Las aglutininas y opsoninas frecuentemente son asociadas como lectinas. Las lectinas del plasma son proteínas multiméricas complejas que llevan varios sitios para la unión de moléculas objetivos. Usualmente la

prueba revela la presencia de tales moléculas en el plasma es la reacción inmunológica estándar de aglutinación de células indicadoras (eritrocitos en vertebrados, bacterias, y células de hongos) (Yakovleva et al 2001).

Datos obtenidos en moluscos indican que los eritrocitos son aglutinados por el plasma de los bivalvos y que este es sustancialmente mas grande que el de los gasterópodos, esto puede deberse a la presencias de múltiples isoformas de diferentes lectinas. Las lectinas de los moluscos bivalvos están compuestas de unidades idénticas que son capaces de reaccionar con diferentes monosacáridos. En los moluscos también existen lectinas que tienen una especificidad muy estrecha como es en el caso de la *Anadara granosa* que tiene moléculas que reaccionan con el ácido irudónico.

El plasma de algunos bivalvos también presenta lectinas con diferentes especificidad que pueden reaccionar contra eritrocitos de equinos y humanos, como es el caso de las lectinas de la *Cassostrea gigas* y *Modioulus modiulus*.

En algunos moluscos también las lectinas son las mayores proteínas en concentraciones relativas respecto a las proteínas totales en el plasma como es el caso de la *Cassostrea virgínica*. (Yakovleva et al 2001).

Sin embargo, la actividad en la aglutinación del plasma puede no solamente tener características que reflejan la eficiencia del sistema interno de defensa de los moluscos y existen otros factores que no causan la aglutinación y que están involucrados en las reacciones de defensa sistema de defensa interno de los gasterópodos. Así, el complejo análisis de las peculiaridades de las reacciones de defensa en varios grupos sistemáticos de moluscos requiere la evaluación de datos sobre las tasas de. Este es el caso de la fagocitosis de material extranjero y su eliminación de los organismos (Yakovleva et al 2001).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

2.1.1 Conchas

El material biológico, es decir las conchas, fueron compradas en los mercados locales de la ciudad de Guayaquil, el tamaño de las conchas se encontraba comprendido entre 4cm. a 6cm. de longitud. Luego fueron llevadas al laboratorio de biología para su posterior procesamiento.

En lo que concierne a las células, estas fueron extraídas luego de la apertura de las valvas de los animales usando jeringuillas con una aguja 21GX11/4". La recolección se hizo mediante la succión con la jeringuilla del fluido que se encontraba al interior de las valvas. Aproximadamente entre 1 a 2 ml fueron recogidos de cada animal, para luego ser

mezclados todos los fluidos en un solo tubo. Esta mezcla de los fluidos de diferentes animales fueron centrifugados en tubos de ensayo para separar el plasma de las células (Figura 2.1). Así, las muestras del plasma fueron utilizadas para los ensayos de halo de inhibición mientras que las células fueron usadas para los análisis turbidométricos. La sangre para realizar los frotis fue utilizada cruda, es decir, no fueron centrifugadas. Para realizar los ensayos de separación de células mediante gradiente isopícnico, las células fueron recolectadas en la Solución Modificada de Alsever compuesta por Citrato de Sodio 30 mM, Glucosa 115 mM, Cloruro de sodio 338 mM, Etilendiamino tetra-ácido acético (EDTA) 10 mM a un pH de 7.2.

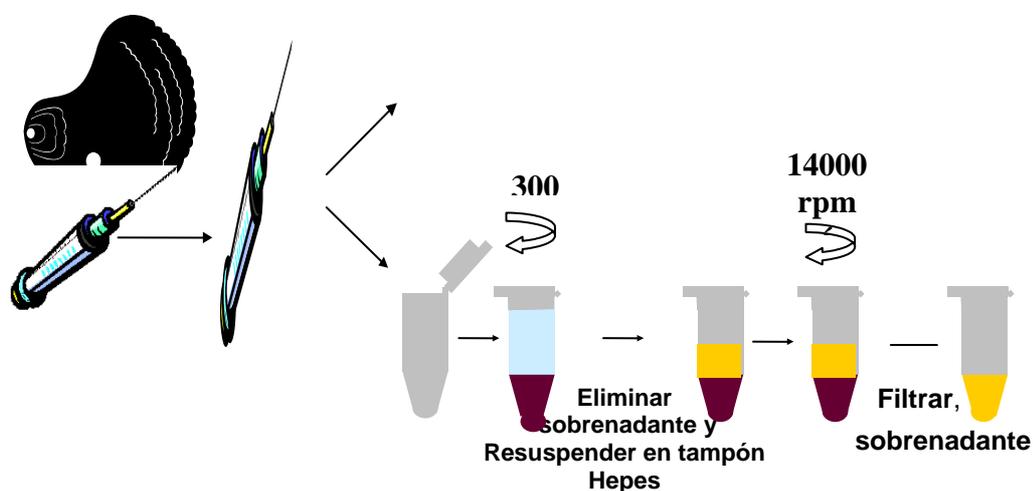


FIGURA 2.1. Diagrama de protocolo para la de obtención muestras de plasma y células circulantes de concha prieta

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

2.1.2 Bacterias

Las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos de halo de inhibición y turbidométricos fueron cepas donadas gentilmente por el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA). Así el CSA donó para este estudio 3 cepas de Gram (+) y 5 cepas Gram (-), las 3 cepas Gram (+) habían sido previamente identificadas en el CSA como *Bacillus sp.* Las cepas Gram (-) habían también sido identificadas por el CSA como *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus* y *Escherichia coli* D31.

2.2 Separación de células

La separación de las células fue realizada utilizando un gradiente discontinuo de Percoll (Sigma), mediante centrifugación isopícnica. El principio de esta técnica se basa en el uso de la centrifugación para provocar una migración de las células a través de un gradiente con soluciones de distinta densidad. El Percoll es utilizado para esta técnica, ya que es una sustancia inerte que no permite que las células se activen mientras migran a través de esta sustancia. El propósito de este proceso es separar a las células de acuerdo a su densidad, ya que las células migrarán gracias a la fuerza g hasta que encuentren en su equivalente de densidad, después de lo

cual no migrarán más. En esta forma se pueden separar células de acuerdo a su densidad.

Previo a la recolección de las células con la Solución Modificada de Alsever, sustancia que impide que las células se agreguen, las células fueron mantenidas en frío hasta su posterior uso en la centrifugación.

Para realizar la separación isopícnica de las células circulantes de la concha prieta se prepararon distintas soluciones de Percoll diluidas en la Solución Balanceada de Sales de Hanks (HBSS). Así, se prepararon soluciones que contenían Percoll en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50% y 60 % de Percoll. Luego se agregaron manualmente utilizando la pipeta, 2 ml de cada solución en un tubo de ensayo de cada una de las soluciones de diferente concentración de Percoll. Cada una de las soluciones fue depositada en un orden descendente de su concentración de Percoll, es decir primero se colocó la capa de 60%, luego la de 50% y así consecutivamente.

Una vez terminada la preparación del tubo con diferentes concentraciones de Percoll se procedió a depositar 6 ml de la solución que contenía las células en el tubo de ensayo donde previamente se había realizado el gradiente discontinuo de Percoll. Los tubos de ensayo

preparados con las soluciones de Percoll y la solución de células fueron centrifugados a 15g por 40 minutos a temperatura ambiente.

2.3 Frotis y Tinción.

Una vez recogidas las células sin anticoagulante fueron depositadas unos 50µl de la solución que contenía las células en la placa portaobjetos. Luego esta solución fue esparcida en toda la placa portaobjetos con la ayuda de otra placa y se las dejó secar. Una vez secos los portaobjetos, se procedió a teñir las células utilizando la solución de Wrigth. La tinción se llevó a cabo depositando una fina capa del colorante sobre el extendido de las células durante 2 minutos, luego los portaobjetos fueron enjuagados con abundante agua. Finalmente los portaobjetos fueron secados a temperatura ambiente antes de proceder a la observación de las células teñidas al microscopio óptico (Motic, B1 series)

2.4 Domesticación de cepas bacterianas

Antes de poder realizar los ensayos turbidométricos, era necesario establecer cuantitativamente y de forma rápida a través de la densidad óptica el número de unidades formadoras de colonia por ml en dicha solución para cada una de las cepas utilizadas en este estudio. Este procedimiento nos permitiría poder trabajar con un número estándar de células en cada uno de los ensayos turbidométricos simplemente conociendo la densidad óptica.

A fin de lograr este objetivo primero se realizó el cultivo de cada una de las cepas bacterianas por separado, utilizando el caldo de cultivo LB (fórmula de LENOX,). Luego de 24 horas de crecimiento fue determinada la densidad óptica de cada una en los cultivos de cada microorganismo, utilizando un espectrofotómetro para microplacas, marca Multiscan. Una vez obtenida la absorbancia para cada uno de las diferentes cultivos de las distintas cepas se procedió a determinar la cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) de dichos cultivos. Para este efecto, diluciones realizadas con cloruro de sodio al 0.25 % de dicho cultivo fueron realizadas y sembradas por triplicado en medio cultivo sólido, LB-agar (formula de Lenox). Así, 100µl de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} fueron inoculadas en 20 ml del medio de cultivo todavía en estado líquido justo antes de que este medio se solidificara. Una vez inoculadas las cepas en los 20 ml de medio de cultivo, éstas fueron depositas en una caja de Petri para que se solidifique el medio con las bacterias. Todas las cepas bacterianas fueron incubadas a temperatura ambiente entre 24 y 48 horas excepto las cajas con la cepa de *E coli* D31 que fueron incubadas a 37 °C.

El número de UFC/ml de la bacterias Gram (-) fue determinado luego de 24 horas de crecimiento, excepto por la cepa identificada como *V. anguillarum*, a partir de cual se pudo obtener un conteo a las 48 horas. En el caso de las cepas Gram (+) se determinó el número de UFC/ml después de

48 horas de cultivo en el medio sólido. Cabe anotar que como control interno de la manipulación se utilizó el crecimiento de la cepa tipificada de *E. coli* D31, cepa para la cual ha sido experimentalmente determinado que una absorbancia de 1 corresponde un número de 1.2×10^9 bacterias por ml.

2.5 Ensayos de actividad antibacteriana por halos de inhibición.

Los ensayos de actividad antibacteriana por halos de inhibición fueron realizados como una primera aproximación para determinar en forma rápida, pero sin una evaluación cuantitativa de la capacidad de una sustancia determinada para inhibir el crecimiento bacteriano. Este ensayo consiste en realizar un cultivo bacteriano en todo el agar, en el cual se realizan pequeñas perforaciones donde se colocan las sustancias de prueba. Así, si la sustancia a ser probada presenta actividad antibacteriana generará un halo de inhibición alrededor de la perforación que contiene la sustancia de prueba. En esta forma mientras más grande es el halo de inhibición mayor es el poder antibacteriano de la sustancia de prueba. (Fig. 2.2)

El ensayo de halos de inhibición se realizó en tubos que contienen un volumen de 15-20 ml de LB agar (formula de Lenox), estos tubos fueron mantenidos en un Baño María, para evitar su solidificación. En cada uno de los tubos utilizados se realizó el inóculo de 2×10^6 bacterias cuando estos todavía se encontraban en estado líquido, los cuales fueron homogenizados,

antes de ser colocados en las cajas de Petri para permitir su solidificación. Una vez que el LB agar se ha solidificado, utilizando la parte gruesa de las pipetas Pasteur se procedió a realizar 5 perforaciones en el medio sólido, estas perforaciones tienen un diámetro de 0.6 cm. Las perforaciones fueron efectuadas en un orden específico, el cual se muestra en la figura 2.2. Luego cada perforación fue identificada y marcada en el borde de la caja de Petri antes de colocar 30 µl de la sustancia de prueba en el ensayo de inhibición. Se dejan 2 hoyos sin colocar ninguna sustancia de prueba, en estos hoyos se procederá a colocar las sustancias que serán utilizadas como controles de crecimiento bacteriano y también como control de inhibición.

El control de crecimiento bacteriano fue realizado utilizando una solución salina estéril al 0.5%, esta solución permite determinar algún efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las bacterias. El control de inhibición se lo realiza con una solución preparada previamente con 5% de EDTA, esta sustancia tiene un efecto bacteriostático y sirve para monitorear si el procedimiento ha sido efectuado en forma correcta como un control de reacción.

Todas las cajas conteniendo los ensayos de inhibición de las distintas cepas estudiadas fueron incubadas a temperatura ambiente, excepto las cajas donde se hicieron las pruebas con *E. coli* D31, las cuales fueron

incubadas a 37°C. Así, después de 16 horas de incubación se procedió a determinar la presencia o ausencia de halos de inhibición del plasma las células circulantes de la concha prieta. En las cajas donde no se observó crecimiento en toda la placa fueron observadas posteriormente hasta que el crecimiento bacteriano se ha hecho evidente.

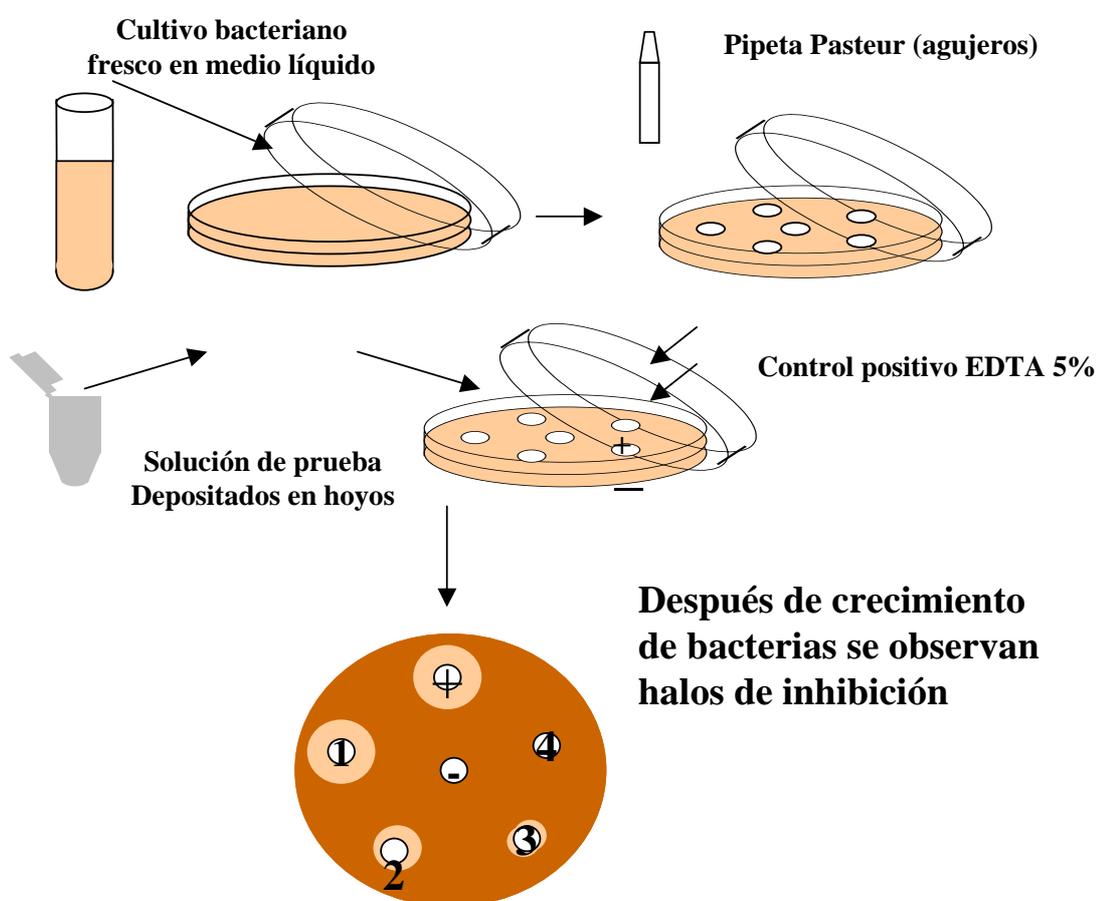


FIGURA 2.2 Diagrama de método de halo de inhibición utilizado para la detección de actividades antibacterianas.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

2.6 Ensayo turbidométrico

El propósito de realizar ensayos turbidométricos es de realizar una evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de las células circulantes de la concha prieta. El principio de estos ensayos se fundamenta en la capacidad de generar turbidez de las bacterias que se encuentran disueltas en el medio, en esta forma se puede evaluar el crecimiento de las bacterias a través de un espectrofotómetro que nos ayuda a cuantificar la turbidez. Así, evaluando la turbidez del medio de cultivo podemos obtener una cuantificación del efecto de una sustancia de prueba sobre el crecimiento de una determinada bacteria. Esta técnica necesita en paralelo de evaluar la turbidez de del crecimiento de esa bacteria sin la presencia de la sustancia de prueba (Control de crecimiento bacteriano). Así, si los valores obtenidos de turbidez de el crecimiento bacteriano en presencia de la sustancia de prueba son menores que los del control de crecimiento bacteriano, entonces podemos establecer un efecto inhibitorio de dicha sustancia sobre esa cepa. Además, la turbidez nos arroja valores numéricos que nos permiten establecer un valor relativo que denominaremos porcentaje de inhibición el cual nos permitirá estimar la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de esa sustancia. El método utilizado en este estudio es una adaptación del ensayo realizado por Tapia en 1997

En la realización de los ensayos turbidométricos fueron solo fueron utilizados los sobrenadantes de los extractos celulares los cuales fueron obtenidos mediante la centrifugación a 785 g ó 17092 g durante 5 minutos (Fig 2.1). El sobrenadante fue recuperado y filtrado utilizando filtros de 0.2 μm (milipore), luego este filtrado fue utilizado para realizar los ensayos turbidométricos de inhibición de crecimiento bacteriano.

El análisis turbidométrico fue llevado a cabo en un una microplaca de 96 hoyos en donde se mezclaron 10 μl de muestra con 10 μl de suspensión bacteriana disuelta en tampón Hepes descrito por Lijima et al, 2003 (50 mM Hepes/NaOH, pH 7,4), incubándolos por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de este periodo se agregaron 180 μl de medio de cultivo LB, incubándolas a temperatura ambiente durante 16 horas. Cada muestra fue analizada por triplicado. Además se llevó un control del crecimiento de las cepas en ausencia de la sustancia de prueba colocando 10 μl de tampón Hepes con 10 μl de suspensión bacteriana incubándolas por 1 hora a temperatura ambiente y agregando luego 180 μl de medio de cultivo LB.

También se llevaron a cabo controles de inhibición del crecimiento microbiano depositando en los hoyos 10 μl de solución de EDTA al 1% con 10 μl de suspensión bacteriana incubándolos por 1 hora a temperatura

ambiente y luego agregando 180 µl de medio de cultivo LB. Tanto los controles de crecimiento como de inhibición también fueron realizados por triplicado. Finalmente luego de 16 horas de incubación a temperatura ambiente la microplaca de 96 hoyos donde se depositaron las pruebas con las muestras, los controles de crecimiento y de inhibición fue sometida a lectura de la turbidez usando un espectrofotómetro.

A fin de estimar la capacidad de inhibición de los distintos tratamientos, los resultados son representados como porcentaje de inhibición de la muestra para cada una de las cepas ensayadas, el porcentaje de inhibición fue obtenido usando la siguiente fórmula:

(Absorvancia de muestra-Control de inhibición)

% de Inhibición = _____ X 100

Control de crecimiento

2.7 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Statistica, mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía, entre los efectos de crecimiento de la absorbancia de los controles positivos, sobrenadante de células centrifugadas a 17092g, 785g y EDTA. Una vez identificadas las diferencias significativas por ANOVA con un $p > 0.05$, se procedió a un análisis de comparación de medias por el método de Scheffé.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

En una se puso en evidencia que el contenido de los fluidos obtenidos en la concha prieta estaba principalmente compuesto por células. Esta composición celular llega ser el 40% en volumen del contenido del fluido que fue objeto de este estudio. Este hecho fue confirmado mediante la centrifugación de dichas muestras a 15 g provocando una sedimentación que correspondía a una fase oscura que se acumulaba en el fondo del tubo.

Observaciones al microscopio de dichas células nos dieron una imagen de morfología. Estas observaciones fueron realizadas con un microscopio óptico de estas células luego de haber sido teñidas con el colorante de Wrigth. La morfología demuestra la presencia de un citoplasma que se tiñe con una coloración ligeramente rosada y la presencia de un núcleo teñido de azul. Un detalle interesante que cabe agregar es la presencia de corpúsculos oscuros alrededor de todo el citoplasma (Figura 3.1 y 3.2). Estas estructuras presentan una coloración café amarillenta cuando estas inclusiones citoplasmáticas fueron observadas con el

microscopio óptico en células que no fueron teñidas con el colorante de Wright. Cabe destacar que estas estructuras al ser observadas en fresco presentan cierta motilidad que se puede observar al microscopio.

El hecho de encontrar estas células presentes en dichos fluidos, indujo un estudio detallado del mismo con un gradiente de Percoll, el cual permite separar las células de acuerdo a su densidad tal como fue descrito en materiales y métodos.

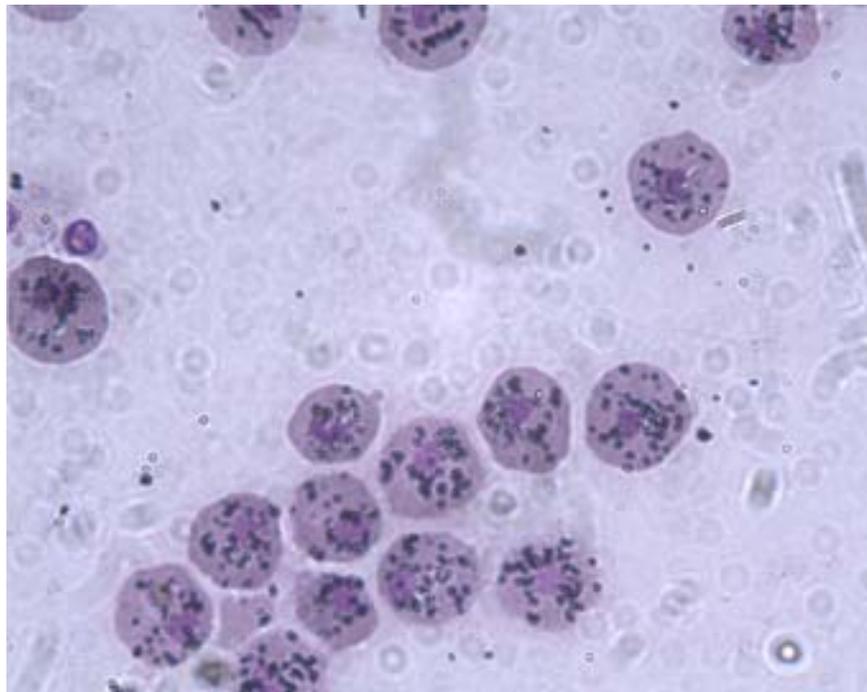


FIGURA 3.1. Foto de células circulantes de la concha prieta, aumento de mil veces. Se pueden distinguir el núcleo teñido de violeta (basófilo) y el citoplasma rosado (eosinófilo) se pueden distinguir estructuras parecidas a gránulos alrededor del citoplasma.

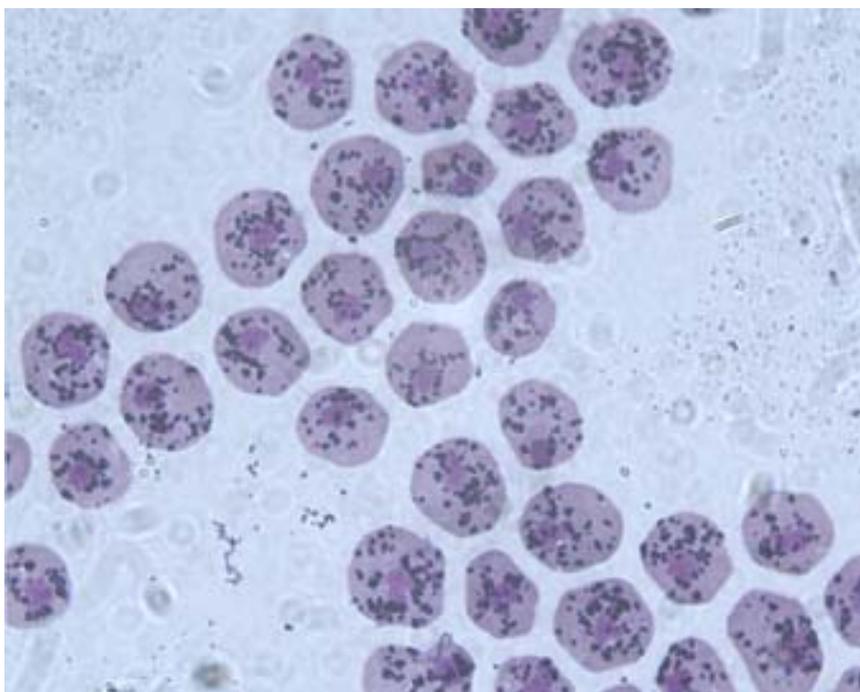


FIGURA 3.2. Foto de células circulantes de la concha prieta, aumento de mil veces. Se pueden distinguir el núcleo teñido de violeta (basófilo) y el citoplasma rosado (eosinófilo) se pueden distinguir estructuras parecidas a gránulos alrededor del citoplasma.

Esta separación isopícnica de estas células circulantes reveló ciertos hechos interesantes como el de encontrar una población mayoritaria en base a su densidad migró hasta la fase comprendida entre una densidad de percoll de 30-40%. Sin embargo, es de anotar también que fueron separadas también otras poblaciones menos densas presentes entre las fracciones de 10-20 % de Percoll, 20-30% de Percoll y 40-50% de Percoll. Este hecho puede ser observado en la figura 3.3.

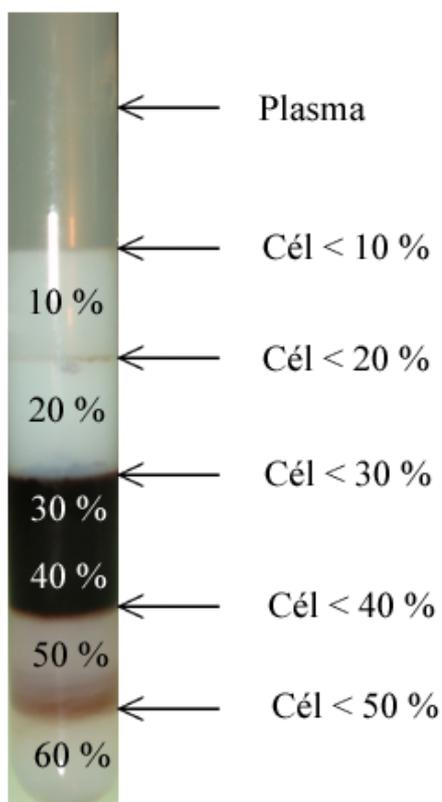


FIGURA 3.3. Diferenciación de células circulantes de la concha prieta de acuerdo a su densidad, obtenido por gradiente discontinuo de Percoll.

Con respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana presente en las células de la concha prieta, se determinó primero el valor de correspondencia en turbidez estimada por espectrofotometría de cada una de las diferentes cepas utilizadas para este estudio. Las cepas de bacillus primeramente fueron identificadas para objeto de este estudio como *Bacillus sp (1)*, *Bacillus sp (2)* y *Bacillus sp (3)*. Así, se logró estimar que los valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría equivalentes a 1 correspondían en el caso del *Bacillus sp (1)* a una densidad de bacterias de

1.7×10^8 UFC/ml. En el caso del *Bacillus sp* (2) se estableció que la densidad óptica de 1 equivalía a una concentración de células de 1.1×10^8 UFC/ml. En la misma forma se determinó para el *Bacillus sp* (3) que la absorbancia de 1 corresponde a 6.9×10^8 UFC/ml. En lo que concierne a las bacterias Gram (-) se estableció también la relación de absorbancia y densidad de microorganismos en una suspensión. Así, para el vibrio identificado como *V. harveyi* se estableció que la densidad óptica de 1 correspondía a la concentración de 1.9×10^8 UFC/ml. En el caso del *V. alginolyticus* la absorbancia de 1 se encuentra relacionada con una densidad de 3.6×10^9 UFC/ml. En lo que concierne a *V. anguillarum* este valor de 1 corresponde a una concentración de 2.8×10^9 UFC/ml. Finalmente también se pudo determinar que para la cepa codificada como *V. vulnificus* la densidad óptica de 1 se encuentra en relación con una densidad de 7.2×10^8 UFC/ml.

La cepa identificada como *E. coli* D31 utilizada en esta prueba como control de interno, generó un valor de 1.16×10^9 UFC/ml para una absorbancia de 1. Este valor se aproxima mucho del valor teórico puesto en evidencia en la literatura de 1.2×10^9 cél/ml. Este hecho, muestra que los valores obtenidos en esta manipulación son confiables. Un resumen de los valores de absorbancia correspondientes para cada una de las cepas utilizadas en este estudio se muestra en la tabla 1.

Los ensayos realizados utilizando la técnica de halos de inhibición fueron realizados utilizando el plasma de las células. Estos ensayos no demostraron ningún tipo de inhibición de este fluido sobre ninguna de las diferentes cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

TABLA 1

VALORES DETERMINADOS EXPERIMENTALMENTE DEL NÚMERO DE CÉLULAS POR ML DE CADA UNA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE ESTUDIO CORRESPONDIENTES A UNA DENSIDAD ÓPTICA DE 1 OBTENIDAS EN UN ESPECTROFOTÓMETRO A UNA LONGITUD DE ONDA DE 650 nm.

Cepa	UFC/ml
<i>Bacillus sp-1</i>	1.88*10⁹
<i>Bacillus sp-2</i>	1.70*10⁸
<i>Bacillus sp-3</i>	9.20*10⁷
<i>Escherichia coli D31</i>	1.16*10⁹
<i>Vibrio anguillarum</i>	2.80*10⁹
<i>Vibrio harveyi</i>	1.92*10⁸
<i>Vibrio vulnificus</i>	7.20*10⁸
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.08*10⁹

En esta forma, la utilización de estos fluidos en los ensayos turbidométricos fue descartada, siendo solamente utilizados para estos ensayos, los sobrenadantes de centrifugados de las células circulantes de la concha prieta a 785 g y 17092 g.

Los ensayos turbidométricos para determinar el efecto de los extractos celulares de la concha prieta sobre el *Bacillus sp* (1), no demostraron efecto inhibitorio de esta muestra sobre el crecimiento de esta bacteria. Así, las bacterias de esta cepa sometidas al efecto de los sobrenadantes de los centrifugados a 785 y 17092 g generaron un crecimiento relacionado con una absorbancia media de 0.481 ± 0.088 y 0.501 ± 0.077 respectivamente. Mientras que las bacterias de la cepa *Bacillus sp* (1) que no estuvieron en contacto con la muestra (control de crecimiento) presentaron un crecimiento con un valor de absorbancia de 0.364 ± 0.096 (Gráfico 1). Así, no se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las absorbancias del crecimiento de *Bacillus sp* (1) tratados previamente con sobrenadantes de las células centrifugadas a 785 y 17092 g con respecto al control de crecimiento bacteriano de esta cepa. Por el contrario, se demostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control negativo (crecimiento de bacterias de la cepa *Bacillus sp* (1) previamente tratadas con EDTA al 1 %) con respecto a las absorbancias de los otros tres tratamientos, es decir, control de crecimiento y sobrenadantes de centrifugados a 785 g y 17092 g.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras utilizadas en estos ensayos se estimaron los porcentajes de inhibición de los sobrenadantes de los centrifugados sobre bacterias de la cepa *Bacillus sp* (1). En esta forma, se obtuvieron porcentajes de inhibición negativos de -27 % de inhibición para el sobrenadante de centrifugados a 785 g y - 34% para el sobrenadante del centrifugado a 17092 g (Gráfico 2).

En el caso del *Bacillus sp* (2), los ensayos turbidométricos generaron un valor de absorbancia medio para el crecimiento bacteriano luego del efecto de los sobrenadantes de células de concha prieta centrifugados a 785 g de 0.628 ± 0.059 . Mientras los sobrenadantes centrifugados a 17092 g produjeron un crecimiento con una absorbancia media de 0.478 ± 0.017 para la misma cepa. Las muestras de *Bacillus sp*. 2 que no fueron tratadas con los sobrenadantes (control de crecimiento de la cepa), presentaron luego de 16 horas de crecimiento un valor medio de densidad óptica de 0.970 ± 0.091 , como se puede observar en el gráfico 3. Así, se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancias obtenidas luego de crecimiento entre el control de crecimiento y las absorbancias del crecimiento de *Bacillus sp* (2) tratadas con los sobrenadantes de células centrifugados a 785 y 17092 g. Además, también se establecieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las densidades ópticas del crecimiento de *Bacillus sp* (2) tratados con sobrenadantes de células de concha prieta centrifugados a 785 y 17092 g

con respecto al control negativo con EDTA. Así, los resultados obtenidos, nos permiten establecer valores de porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de la cepa *Bacillus sp* (2) en presencia de sobrenadantes de células de concha prieta de centrifugados a 785 g de 34 %. Mientras los sobrenadantes de células centrifugados a 17092 g exhibieron un porcentaje de inhibición de 50 % sobre dicha cepa bacteriana. Los porcentajes de inhibición de los sobrenadantes de los centrifugados se encuentran resumidos en el gráfico 4.

En lo que concierne al *Bacillus sp* (3), el valor medio de absorbancia del crecimiento de bacterias tratadas con sobrenadantes de células de concha prieta centrifugadas a 785 g fue de 0.457 ± 0.025 . El valor medio de crecimiento de bacterias de la cepa *Bacillus sp.* (3) tratadas con sobrenadantes de éstas células centrifugadas a 17092 g fue de 0.413 ± 0.122 . En lo que concierne al crecimiento de bacterias de esta cepa que no fueron sometidas a tratamiento alguno, luego de 16 horas de incubación, se determinó un valor medio de densidad óptica de 0.254 ± 0.116 . Un resumen de los resultados del crecimiento de bacterias de la cepa *Bacillus sp.* (3) se encuentra en el gráfico 5. No se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control de crecimiento bacteriano de *Bacillus sp* (3) y la absorbancia del crecimiento de los sobrenadantes de las células centrifugadas a 785 y 17092 g sobre bacterias de esta cepa. Sin embargo,

con respecto a *Bacillus sp* (3) se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control negativo con EDTA con respecto tanto a las absorbancias del control de crecimiento como la absorbancia de las bacterias tratadas con los sobrenadantes de las células centrifugadas a 785 y 17092 g. Las densidades ópticas obtenidas generaron porcentajes de inhibición negativos de crecimiento de la cepa *Bacillus sp* (3) tanto para las muestras de los sobrenadantes de centrifugados a 785 g y 17092 g de -126% y -115% de inhibición respectivamente (Gráfico 6)

En lo que corresponde a *V. alginolyticus*, las bacterias de esta cepa tratadas con sobrenadantes de centrifugados de las células circulantes de concha de prieta a 785 g presentaron luego del periodo de incubación presentaron una absorbancia de 0.615 ± 0.026 . Igualmente las bacterias de *V. alginolyticus* sometidas a la presencia de sobrenadantes de centrifugados de estas células a 17092 g luego de la incubación generaron una densidad óptica de 0.593 ± 0.082 (Gráfico 7). Mientras que las bacterias de *V. alginolyticus* que no estuvieron en contacto con sobrenadante alguno exhibieron una absorbancia de 0.627 ± 0.017 .

Los análisis estadísticos no demostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la absorbancia del control de crecimiento de *V. alginolyticus* y la absorbancia del crecimiento de bacterias de esta cepa tratadas con sobrenadantes de centrifugados a 785 y 17092g. En lo que concierne a *V. alginolyticus*, sólo se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control negativo y las absorbancias de los crecimientos de los otros tratamientos, control de crecimiento y sobrenadantes de centrifugados de células a 785 g y 17092 g. Los valores obtenidos muestran un porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa *V. alginolyticus* por el sobrenadante de centrifugado de células a 785 g de 2%, mientras el porcentaje de inhibición obtenido con el sobrenadante de células centrifugadas a 17092 g fue de 5% (Gráfico 8).

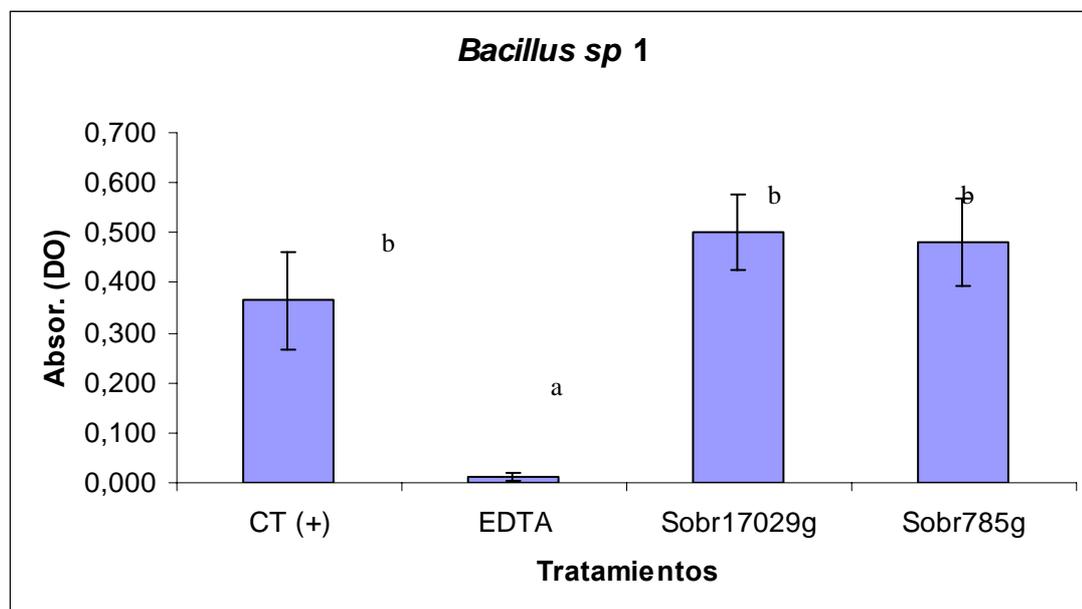


Gráfico 1. Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de *Bacillus sp 1* con una sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

CT(+): Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación del tampón Hepes como sustancia de prueba, EDTA: Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación con EDTA al 1% como sustancia de prueba. 17092g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 17092g de las células circulantes de la concha prieta. 785 g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 785g de las células circulantes de la concha prieta. Letras minúsculas representan diferencias significativas.

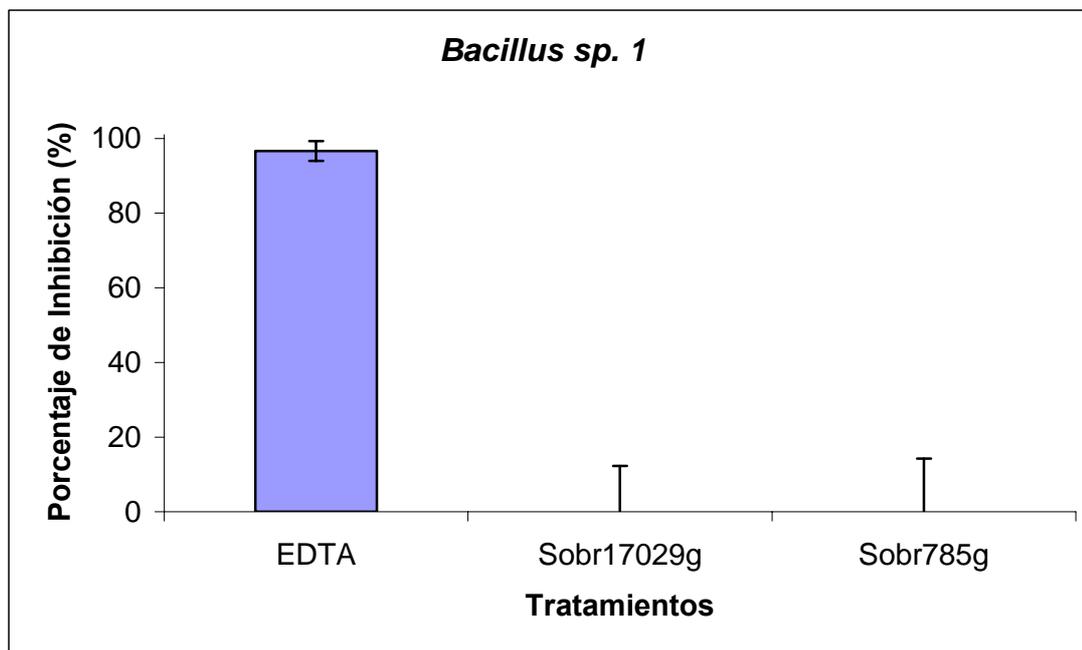


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa *Bacillus sp 1* luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

EDTA: porcentaje de inhibición inducido por una solución de EDTA de 1% como sustancia de prueba, 17092g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 17092g como sustancia de prueba. 785g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 785g como sustancia de prueba.

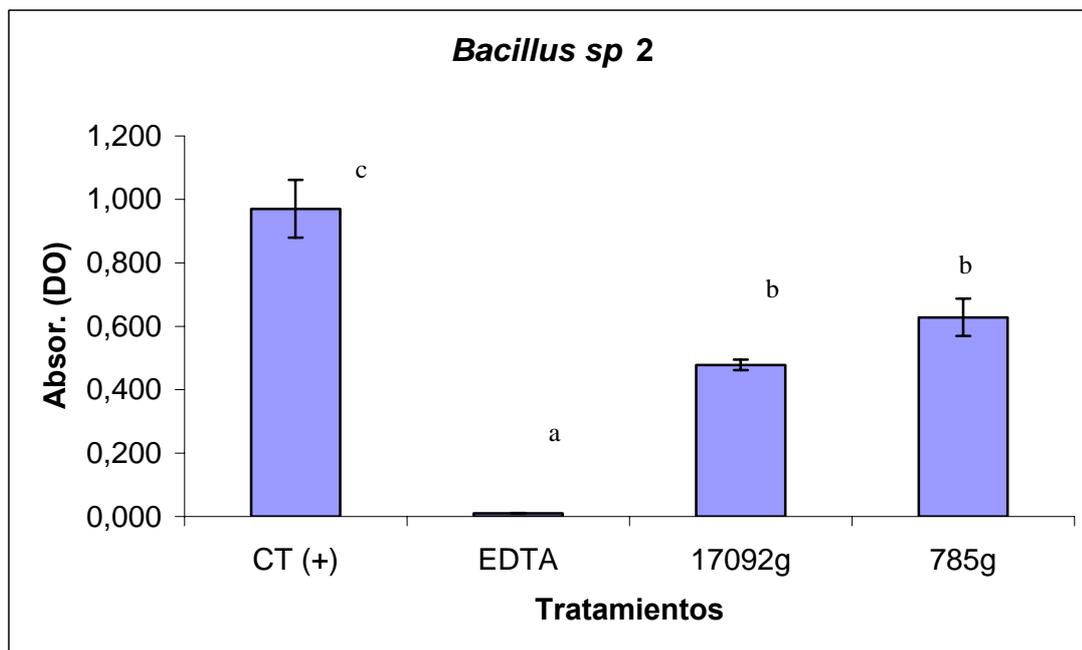


Gráfico 3. Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de *Bacillus sp 2* con una sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

CT(+): Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación del tampón Hepes como sustancia de prueba, EDTA: Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación con EDTA al 1% como sustancia de prueba. 17092g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 17092g de las células circulantes de la concha prieta. 785 g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 785g de las células circulantes de la concha prieta. Letras minúsculas representan diferencias significativas.

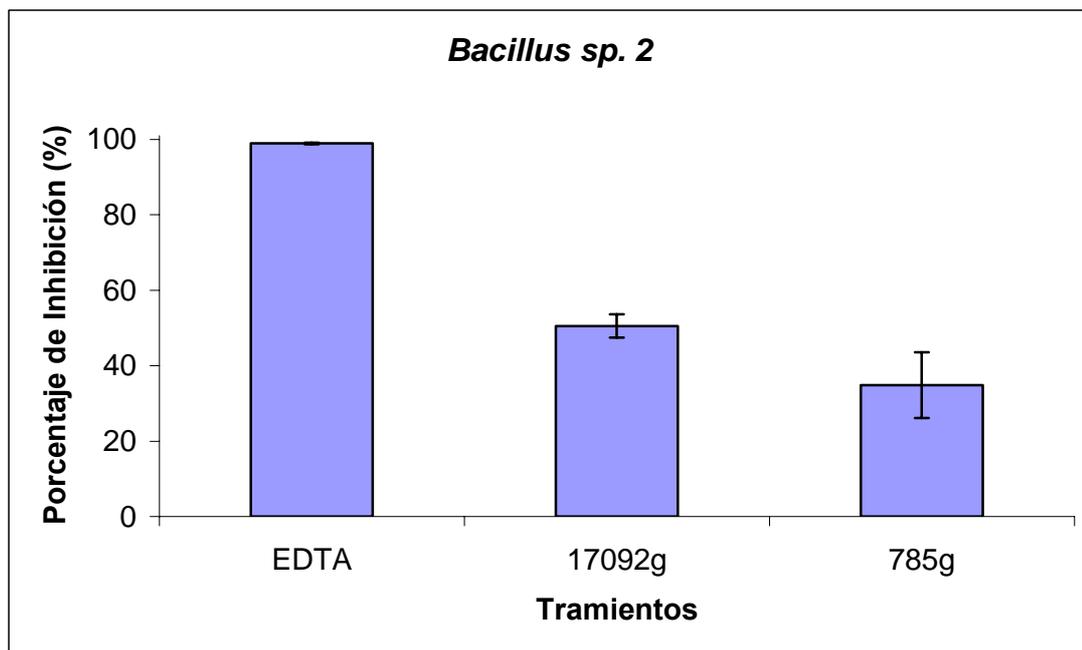


Gráfico 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la *Bacillus sp. 2* luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

EDTA: porcentaje de inhibición inducido por una solución de EDTA de 1% como sustancia de prueba, 17092g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 17092g como sustancia de prueba. 785g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 785g como sustancia de prueba.

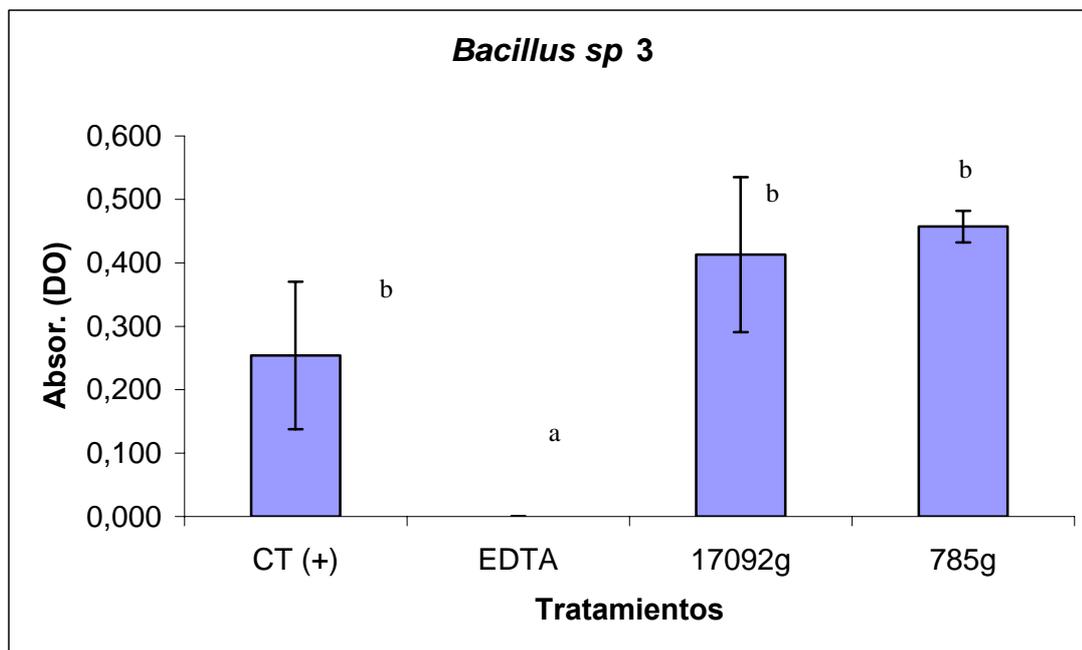


Gráfico 5. Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de *Bacillus sp 3* con una sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

CT(+): Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación del tampón Hepes como sustancia de prueba, EDTA: Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación con EDTA al 1% como sustancia de prueba. 17092g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 17092g de las células circulantes de la concha prieta. 785 g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 785g de las células circulantes de la concha prieta. Letras minúsculas representan diferencias significativas.

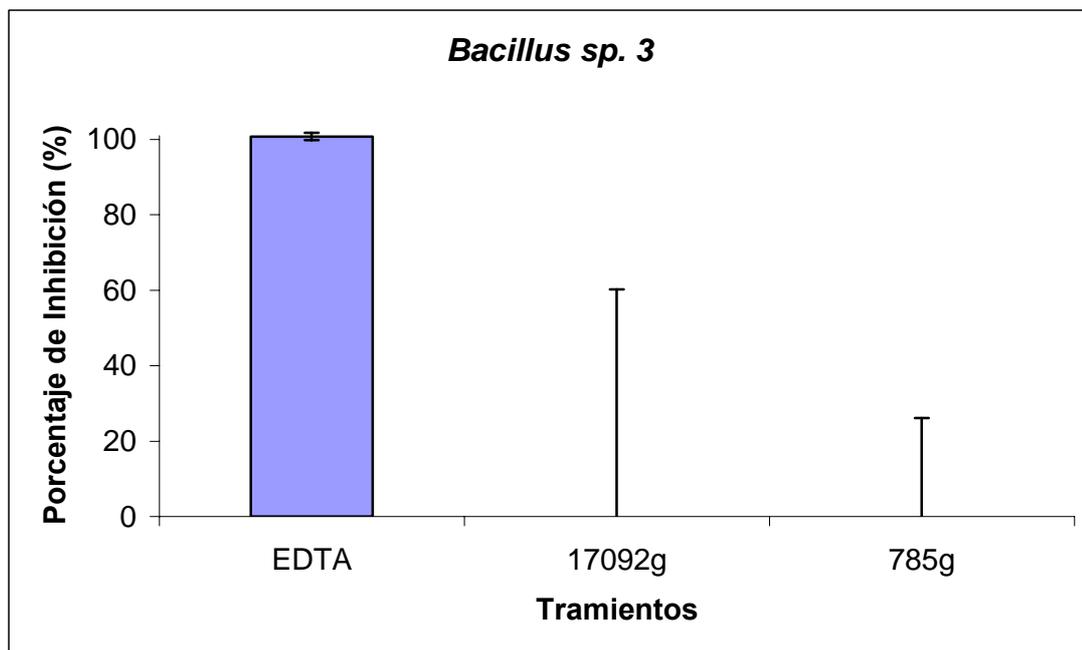


Gráfico 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa *Bacillus sp.3* luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

EDTA: porcentaje de inhibición inducido por una solución de EDTA de 1% como sustancia de prueba, 17092g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 17092g como sustancia de prueba. 785g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 785g como sustancia de prueba.

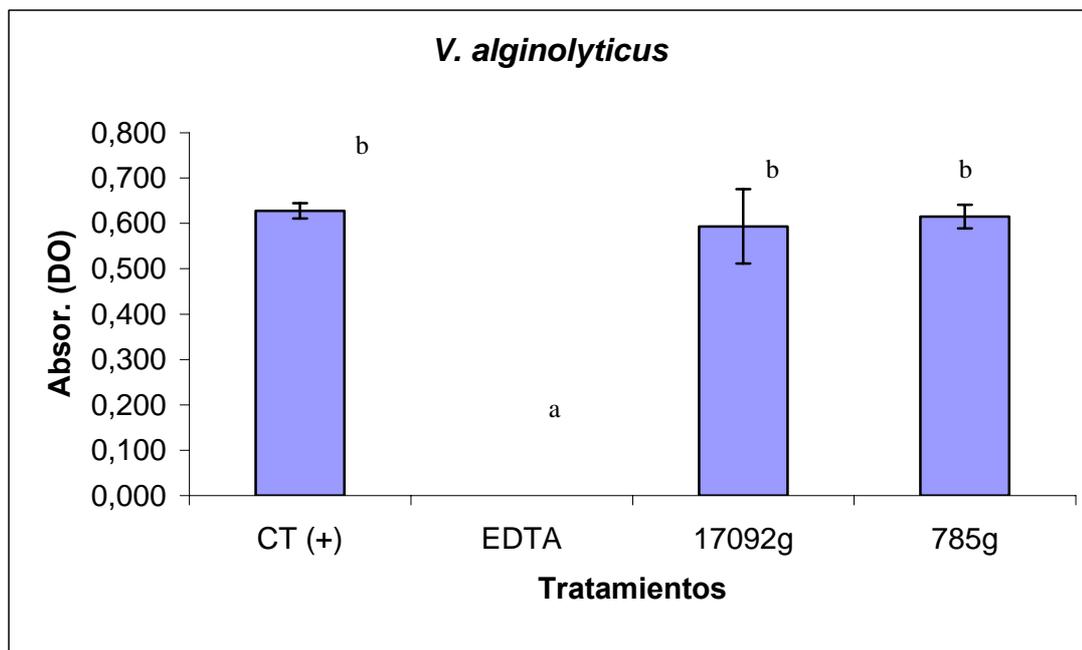


Gráfico 7. Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de *V. alginolyticus* con una sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

CT(+): Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación del tampón Hepes como sustancia de prueba, EDTA: Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación con EDTA al 1% como sustancia de prueba. 17092g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 17092g de las células circulantes de la concha prieta. 785 g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 785g de las células circulantes de la concha prieta. Letras minúsculas representan diferencias significativas.

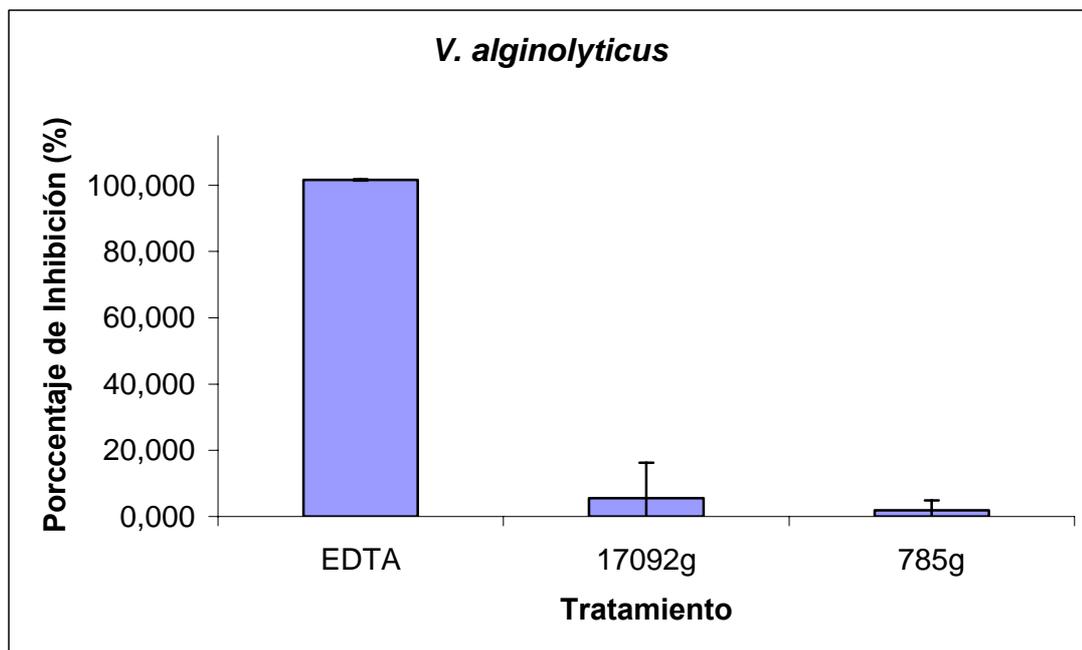


Gráfico 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa *V. alginolyticus* luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

EDTA: porcentaje de inhibición inducido por una solución de EDTA de 1% como sustancia de prueba, 17092g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 17092g como sustancia de prueba. 785g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 785g como sustancia de prueba.

Para el caso de la cepa identificada como *V. harveyi*, se logró determinar bacterias de esta cepa que fueron sometidas al contacto de 1 hora en presencia de sobrenadantes de centrifugados a 785 g de concha prieta generaron una absorbancia de 0.001 ± 0.002 . Así también, las células en contacto con los sobrenadantes de células de concha prieta producidos por la centrifugación de estas células a 17092 g presentaron una absorbancia de 0.005 ± 0.005 . En lo que concierne al control de crecimiento, bacterias de la cepa *V. harveyi* sin ningún contacto con los sobrenadantes de centrifugados de las células de la concha presentaron un crecimiento relacionado con una densidad óptica de 0.254 ± 0.010 (Gráfico 9). Se determinó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia obtenida del control de crecimiento y la absorbancia del crecimiento de los otros tres tratamientos, EDTA 1% y los sobrenadantes de centrifugados tanto a 785 y 17092 g. A partir de los valores previamente obtenidos se generaron los porcentajes de inhibición de los sobrenadantes de los centrifugados de las células de la concha a 785 g sobre *V. harveyi* de 99 %. Mientras los sobredantes de los centrifugados de las células a 17092 g presentaron un porcentaje de inhibición del 98% (Gráfico 10).

En el caso de *V. vulnificus*, el crecimiento de bacterias de esta cepa tratadas con muestras de sobrenadantes de centrifugados de células de

concha prieta a 785 g presentaron una densidad óptica de 0.288 ± 0.023 , luego del periodo de incubación. Del mismo modo bacterias de *V. vulnificus* que estuvieron en contacto con los sobrenadantes de los centrifugados de células de concha prieta a 17092 g luego de la incubación produjeron una absorbancia de 0.261 ± 0.051 . Sin embargo, bacterias de *V. vulnificus* que no fueron sometidas a tratamiento alguno, presentaron una densidad óptica de 0.267 ± 0.023 (Gráfico 11). No se detectaron diferencias significativas entre la absorbancia del control de crecimiento y las absorbancias del crecimiento de células tratadas con sobrenadantes de los centrifugados tanto a 785 g como a 17092 g. Sin embargo, si se detectaron diferencias significativas entre la absorbancia del crecimiento de esta cepa tratada con EDTA con respecto a las absorbancias del control de crecimiento y sobrenadantes de centrifugados a 785 y 17092 g. Así, se pudo determinar el porcentaje de inhibición producido por los sobrenadantes de centrifugados a 785 g de células sobre el crecimiento de bacteria de la cepa identificada como *V. vulnificus* de -7% . Mientras, los sobrenadantes de centrifugados de células circulantes de concha prieta a 17092 g mostraron un porcentaje de inhibición del 2% (Gráfico 12).

En lo que concierne al efecto sobre el crecimiento de *V. anguillarum* de los sobrenadantes de los centrifugados de las células de la concha prieta a 785 g se determinó luego de 16 horas de crecimiento una absorbancia de

0.122 ± 0.009. En la misma forma, el crecimiento de bacterias de la cepa de *V. anguillarum* tratados con sobrenadantes de las células centrifugadas a 17092 g generaron una densidad óptica de 0.096 ± 0.002. El control de crecimiento bacteriano de esta cepa en ausencia de cualquier tratamiento presentó un valor de absorbancia de 0.177 ± 0.018 (Gráfico 13). Así, se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control de crecimiento y las absorbancias de los sobrenadantes de centrifugados a 785 y 17092 g. También se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia determinada por el control negativo con EDTA y los otros tres tratamientos control de crecimiento, sobrenadantes de centrifugados a 785 g y 17092g. En esta forma, se pudo establecer que los sobrenadantes de centrifugados de las células circulantes a 785 g presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento de las bacterias de la cepa *V. anguillarum* del 31 %. En la misma forma, los sobrenadantes de centrifugados a 17902 g mostraron un porcentaje de inhibición del 45 % (Gráfico14).

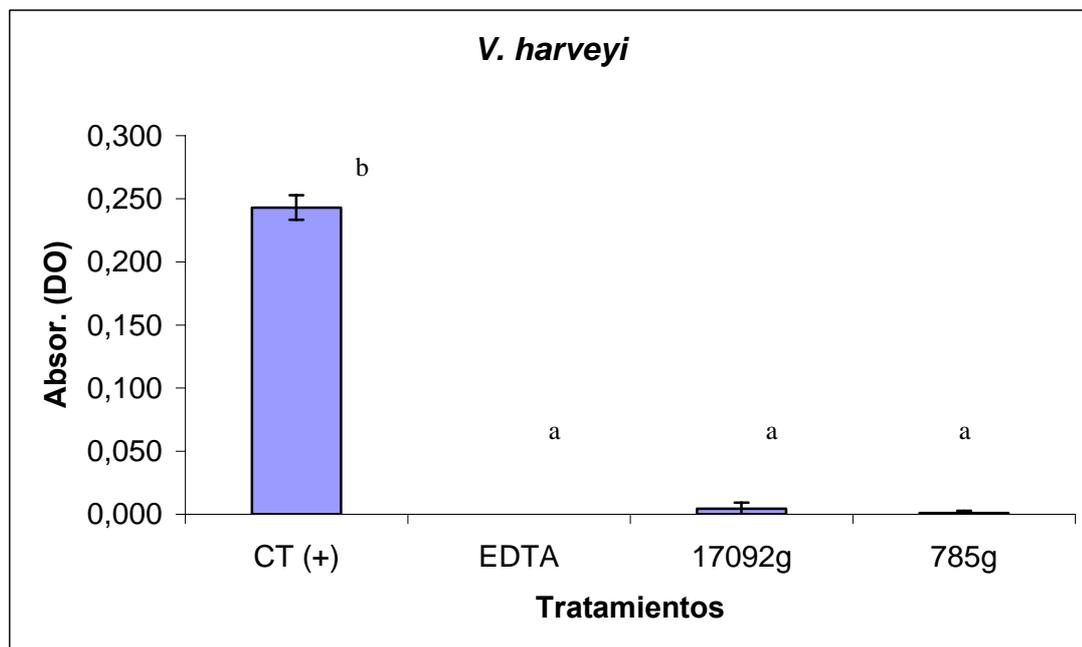


Gráfico 9. Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de *V. harveyi* con una sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

CT(+): Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación del tampón Hepes como sustancia de prueba, EDTA: Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación con EDTA al 1% como sustancia de prueba. 17092g : Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 17092g de las células circulantes de la concha prieta. 785 g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 785g de las células circulantes de la concha prieta. Letras minúsculas representan diferencias significativas.

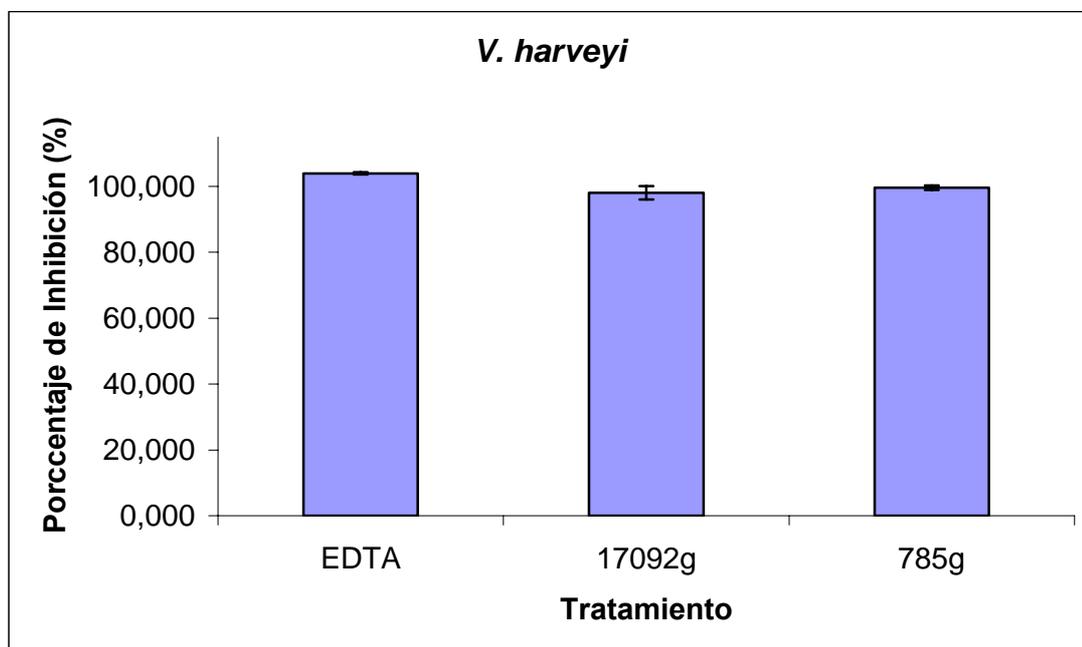


Gráfico 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa *V. harveyi* luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

EDTA: porcentaje de inhibición inducido por una solución de EDTA de 1% como sustancia de prueba, 17092g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 17092g como sustancia de prueba. 785g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 785g como sustancia de prueba.

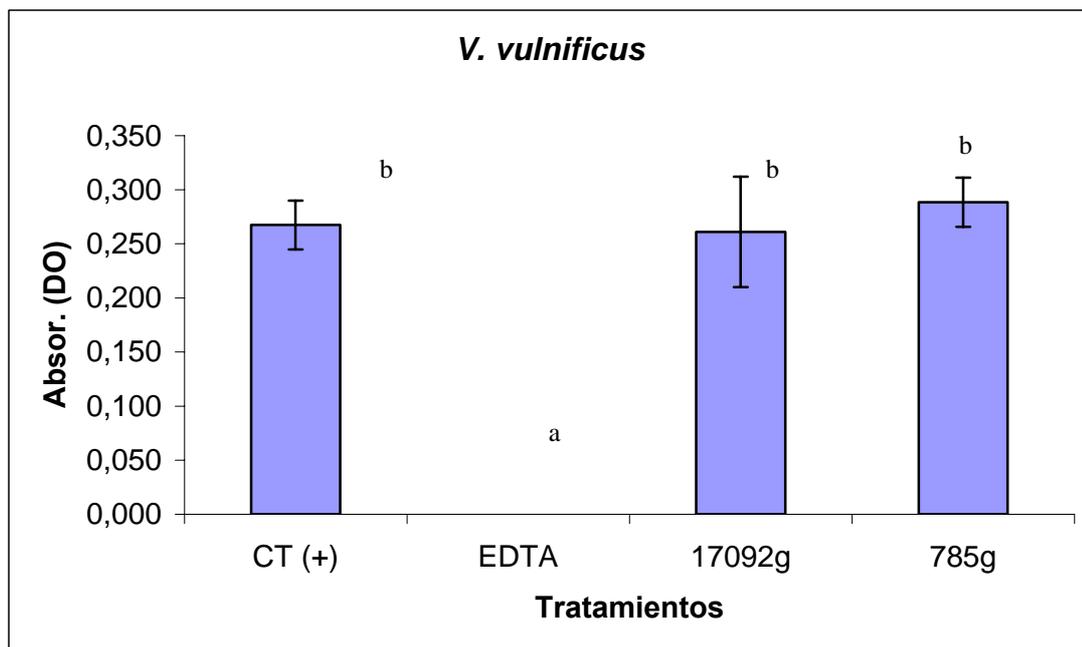


Gráfico 11. Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de *V. vulnificus* con una sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

CT(+): Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación del tampón Hepes como sustancia de prueba, EDTA: Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación con EDTA al 1% como sustancia de prueba. 17092g : Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 17092g de las células circulantes de la concha prieta. 785 g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 785g de las células circulantes de la concha prieta. Letras minúscula representan diferencias significativas.

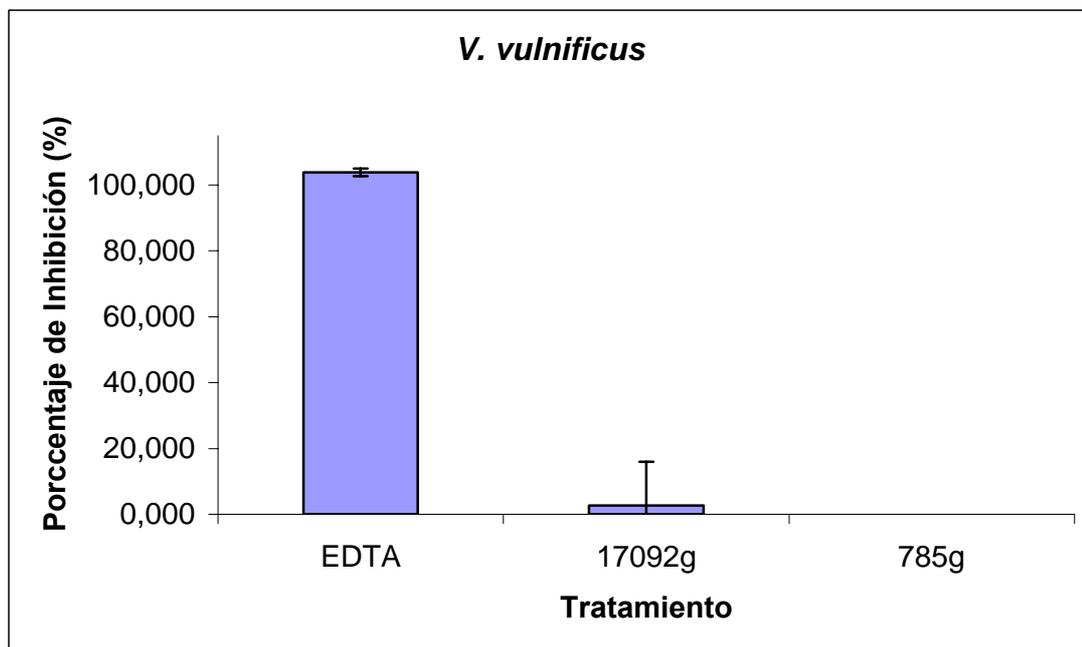


Gráfico 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa *V. vulnificus* luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

EDTA: porcentaje de inhibición inducido por una solución de EDTA de 1% como sustancia de prueba, 17092g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 17092g como sustancia de prueba. 785g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 785g como sustancia de prueba.

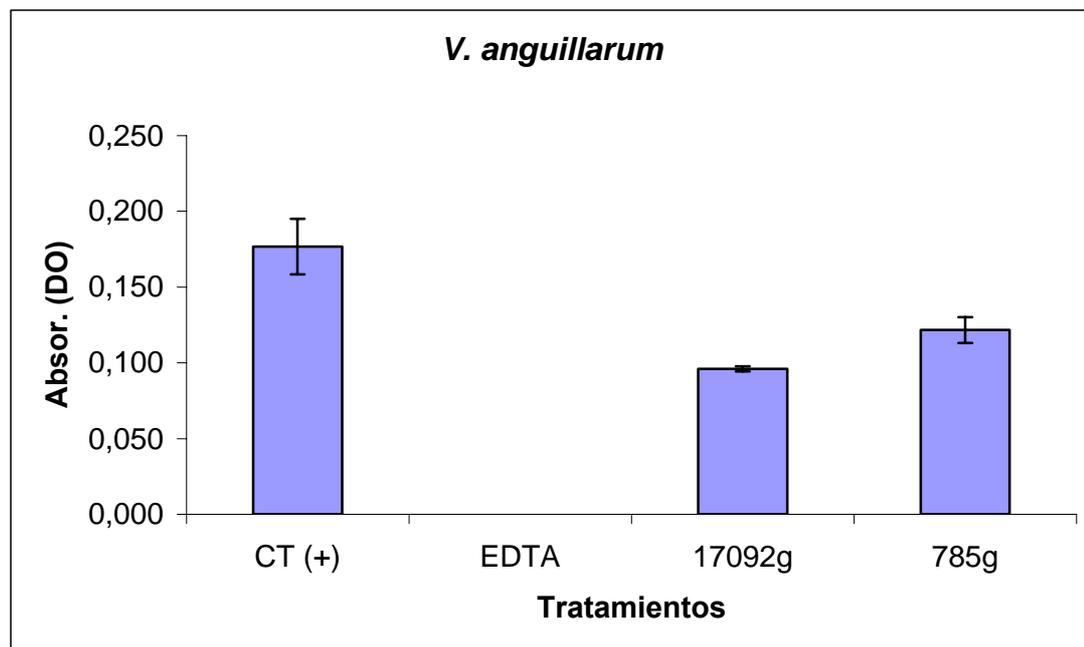


Gráfico 13. Estimación de la absorbancia del crecimiento microbiano 16 horas después de la incubación de 1 hora de bacterias de la cepa de *V. anguillarum* con una sustancia de prueba.

Elaborado por Alberto: Fernández Sigcho

CT(+): Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación del tampón Hepes como sustancia de prueba, EDTA: Absorbancia del crecimiento bacteriano luego de la incubación con EDTA al 1% como sustancia de prueba. 17092g : Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 17092g de las células circulantes de la concha prieta. 785 g: Densidad óptica del crecimiento bacteriano luego de la incubación con los sobrenadantes de los lisados centrifugados a 785g de las células circulantes de la concha prieta. Letras minúscula representan diferencias significativas.

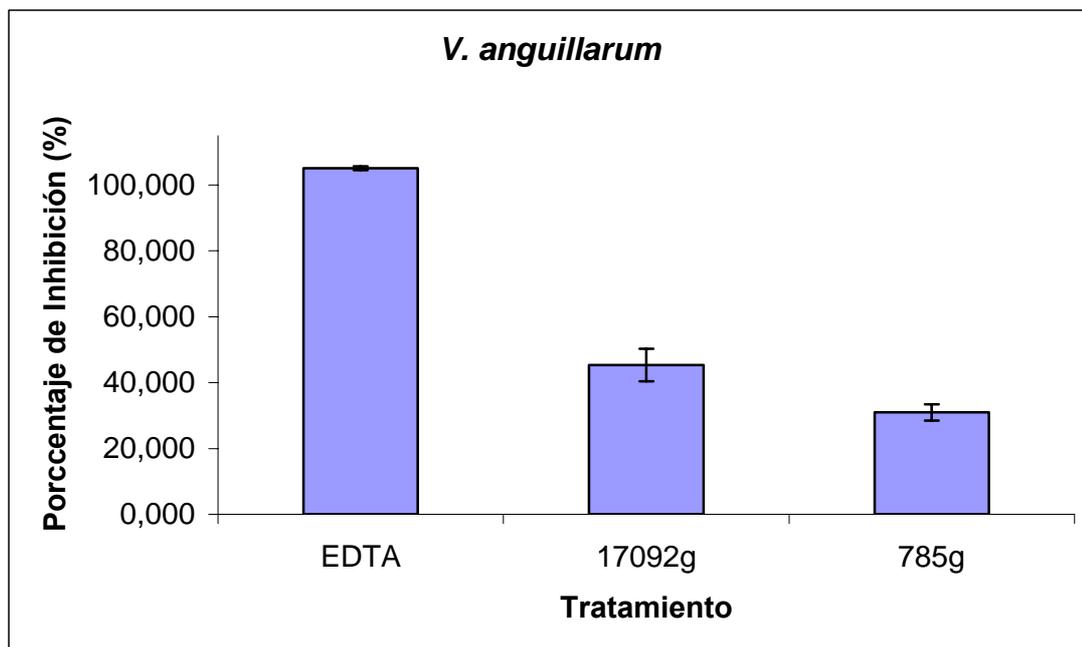


Gráfico 14 Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de bacterias de la cepa *V. anguillarum* luego de 16 horas de crecimiento después de la incubación de 1 hora con la sustancia de prueba.

Elaborado por: Alberto Fernández Sigcho

EDTA: porcentaje de inhibición inducido por una solución de EDTA de 1% como sustancia de prueba, 17092g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 17092g como sustancia de prueba. 785g: porcentaje de inhibición inducido por los sobrenadantes de los lisados de las células circulantes de la concha prieta centrifugados a 785g como sustancia de prueba.

DISCUSIÓN

Las células circulantes de los moluscos han sido caracterizadas en 2 categorías los amebocitos y eritrocitos. Los eritrocitos particularmente han sido puestos en evidencia en bivalvos, siendo estos bivalvos llamados conchas de sangre, debido principalmente a que estos eritrocitos poseen hemoglobina al interior de las células (Read, 1966 y Hill and Welsh, 1966).

En el presente trabajo se determinó que la pigmentación de fluido circulante de la concha prieta tiene su origen únicamente en el interior de las células gracias a los ensayos de sedimentación de estas células circulantes. Así, una vez que las células fueron precipitadas por centrifugación el plasma sin contenido celular quedaba completamente incoloro. En esta forma se puede sostener que las células de la concha prieta pueden contener hemoglobina, como sus similares (otras almejas), al interior de los eritrocitos.

Las observaciones realizadas en el presente trabajo son consistentes con la presencia de eritrocitos con una morfología definida, mostrando un núcleo basófilo y abundantes estructuras café amarillento dispersas en el citoplasma y con un determinado movimiento browniano. En lo que concierne a la parte cuantitativa, de dichas células parecen estar presentes en forma abundante aproximadamente entre 90 a 100 millones de células por ml de fluido de concha prieta.

Los ensayos de separación isopícnica en Percoll de estas células circulantes son consistentes con una diferencia celular en densidad de dichas células. Así, un grupo mayoritario de células fue puesto en evidencia en la fracción correspondiente entre 30 y 40% de Percoll. Los otros tres grupos son ampliamente minoritarios. No se realizaron observaciones morfológicas de dichas células al microscopio, lo cual no permite definir en términos morfológicos, si esta diferencia en densidad, podría estar relacionada a algún fenotipo característico de estas células. Tampoco, podemos llegar a ninguna aseveración sobre alguna diferencia funcional de estas células en relación con la diferencia en densidad. Así, mucho trabajo resta por realizar para definir alguna relación biológica con la diferencia de densidad puesta en evidencia por grupos minoritarios de las células circulantes de la concha prieta.

Los resultados de actividad antibacteriana son concluyentes en el sentido de que el plasma por sí solo no presenta ningún tipo de actividad contra las bacterias probadas en este ensayo. Sin embargo, los sobrenadantes de centrifugados de las células circulantes de la concha prieta mostraron actividad tanto contra una bacteria Gram(+) y 2 bacterias Gram(-). Este hecho soporta la afirmación que cualquiera sea el origen de la actividad antibacteriana descubierta en la sangre de la concha prieta, es un producto o productos que se encuentran al interior de los eritrocitos de este molusco.

Además, también podemos afirmar que este producto y/o productos no es tampoco liberado extracelularmente fuera de las células. En lo que concierne a la actividad antibacteriana encontrada es consistente con la actividad descrita en la literatura en otros moluscos como en el mejillón (Hill R., Welsh J. 1966 y Mitta G 2000). En estos moluscos, los productos responsables de la actividad antibacteriana puesta en evidencia se encuentra circunscrita solamente dentro de las células circulantes, llamadas hemocitos, en los mejillones.

En este trabajo se ha podido determinar no solamente la presencia de actividad en forma cualitativa, si no que se ha llegado a cuantificar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de los centrifugados de las células circulantes de la concha prieta. Así, este hecho, permite observar ciertas particularidades interesantes, como una muy fuerte actividad antimicrobiana contra bacterias de la cepa identificada como *V. harveyi*, en donde el porcentaje de inhibición es casi cercano al 100%. Además, actividades medias que oscilan entre el 30 y el 50 % de inhibición fueron puestas evidencia tanto para bacterias tipificadas como *Bacillus sp* y *V. anguillarum*. Este particular, pone de manifiesto que esta actividad antimicrobiana, además de diversa, en cierto sentido es también específica para cada diferente microorganismo. En esta forma, es difícil de explicar, con la información que disponemos ahora, cual es el significado biológico de

esta diferencia en la efectividad de la actividad antibacteriana en relación con los diferentes microorganismos probados los ensayos de este trabajo.

En esta tesis, se pudo determinar la presencia de actividad antibacteriana de los sobrenadantes de los centrifugados de la concha prieta contra la cepa Gram (+) tipificada *Bacillus sp* (2) y contra las bacterias Gram (-) *V. harveyi* y *V. anguillarum*. Este hallazgo, permite inferir que la actividad antibacteriana encontrada tiene un amplio espectro de acción. Sin embargo, no podemos afirmar su importancia biológica como un mecanismo de defensa de este molusco. En el caso de que tuviera una importancia marcada dentro de la batería de mecanismos de defensa de la concha prieta, es claro que una actividad dual contra Gram (+) y Gram (-) puede tener una importancia radical como componente defensivo del animal. Este hecho le permitiría al molusco poderse defender en forma apropiada contra varios microorganismos patógenos diferentes mediante el uso de la actividad antimicrobiana. Así, podemos hipotetizar que esta diferencia en la actividad antibacteriana dependiente de la cepa podría estar vinculada con algún tipo de adaptación de la concha prieta a su ambiente. Así, microorganismos con los cuales este animal se encuentra confrontado en forma natural y que en cierto modo son inocuos para el desarrollo del mismo, que no necesitan ser excluidos, no son agredidos por efectores inmunes de la concha. En el caso contrario, microorganismos con los cuales, estos moluscos se encuentran en

contacto en su medio natural, y que pueden ser dañinos podrían ser excluidos del mismo mediante el uso de actividades antibacterianas contra dichas cepas bacterianas.

En lo que concierne al origen de la actividad antibacteriana puesta en evidencia en los sobrenadantes de los centrifugados de las células circulantes de la concha prieta, no podemos inferir ninguna hipótesis sobre su naturaleza de la misma. Sin embargo, podríamos descartar que el origen de esta actividad antibacteriana, se encuentre relacionada con algún efector de tipo aglutinina. Esta afirmación se encuentra relacionada con la ausencia de actividad antibacteriana de el plasma de la concha prieta, sabiendo que en otros moluscos la presencia de aglutininas ha sido demostrada (Yakovleva *et al* 2001). Así, permanece un amplio rango de posibilidades que permitan explicar la presencia de actividad antimicrobiana en la concha prieta. Entre ellos, no podemos descartar la presencia de peptidos antimicrobianos que sean responsables en parte de dicha actividad, como ha sido demostrado en el *Mytilus galloprovincialis* (Mita *et al*, 2000). Tampoco, podemos descartar la presencia de efectores enzimáticos u otros tipos de productos celulares de los eritrocitos de la concha prieta como responsables de la actividad antibacteriana.

Una consideración técnica que se debe tener en cuenta en los resultados presentados en esta tesis es que no se puede afirmar que no existe actividad antibacteriana contra las cepas en las cuales no se logró inhibir el crecimiento bacteriano. Esta afirmación se encuentra sustentada en el hecho que los métodos de extracción fueron rudimentarios y simplistas, es decir que en ciertos casos puede haber un efecto de desestimación de las actividades que pudieron ser encontradas. Este hecho radica que las condiciones de los ensayos pueden ser mejoradas con el fin de establecer concluyentemente si éstos lisados pueden presentar una mejor actividad que la demostrada en el marco de esta tesis. No solamente para establecer una menor actividad si no también para concluir la ausencia de dicha actividad contra otras cepas.

Otra pregunta que deberá ser resuelta posteriormente, se encuentra relacionada con algún posible efecto de enmascaramiento o potencialización de la actividad antibacteriana. Dado, que él o los principios activos responsables de esta actividad antibacteriana no han sido caracterizados, no podemos excluir, que en el caso de que existan más de 2 principios activos, éstos puedan interactuar entre ellos. Así, si 2 ó más moléculas, que podrían estar involucradas en esta actividad antibacteriana probablemente tengan un efecto antagónico o sinérgico entre ellas. En esta forma, el trabajo descrito en esta tesis resta como una primera aproximación que permitirá posteriores

estudios en la concha prieta para definir la naturaleza exacta de la presencia de la actividad antibacteriana de los centrifugados de los sobrenadantes de las células circulantes de este molusco.

CONCLUSIONES

Este trabajo es una primera exploración de un sujeto desconocido, como lo es, la determinación y el origen de actividades antibacterianas en la sangre de la concha prieta, y por lo tanto una primera aproximación a un tema de estudio posterior. Sin embargo, a pesar de la falta de información previa sobre este tema se han podido identificar algunas contribuciones, las cuales son desarrolladas a continuación:

1. Los fluidos sanguíneos de la concha prieta presentan diferencias de densidad entre las células circulantes. Dentro de estos grupos caracterizados por la presencia de densidades diferentes se ha determinado la presencia de una población de células mayoritaria con una densidad equivalente al 30-40% de Percoll.

2. El presente estudio demuestra la presencia de actividad antibacteriana en la sangre de la concha prieta contra las cepas identificadas como *Bacillus sp* (2), *V. harveyi* y *V. anguillarum*.

3. El plasma obtenido de la separación en la sangre de los eritrocitos no es responsable, por lo menos bajo nuestras condiciones de estudio de ningún tipo de actividad antibacteriana.

4. Los sobrenadantes de centrifugados a 785 g y 17092 g de las células circulantes de la concha prieta tienen un efecto antibacteriano contra cepas de tipo Gram (+) y Gram (-). Así, esta actividad de los sobrenadantes de los centrifugados de las células circulantes de la concha prieta muestran probablemente un amplio espectro de acción.

5. Los sobrenadantes de los centrifugados de las células circulantes de la concha prieta presentan un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano cercano al 100% de inhibición de la cepa bacteriana identificada como *V. harveyi*.

6. El origen de la actividad antibacteriana demostrada en este estudio, en las células de la concha prieta, se encuentra circunscrito a algún factor o factores que se encuentran en el interior de los eritrocitos de la concha prieta.

RECOMENDACIONES

1. Los resultados obtenidos resumidos en este documento se muestran interesantes y necesitan de una continuación de los mismos para poder determinar, él o los principios activos de esta actividad antibacteriana. Así, se recomienda la continuación de este trabajo, intentando caracterizar el origen de la actividad antibacteriana puesta de manifiesto contra las cepas utilizadas en el transcurso de ésta tesis.

2. En este estudio se determinó diferencias a nivel de densidad entre distintos grupos de eritrocitos de la concha prieta, sería interesante continuar con este estudio para establecer el significado biológico de esta diferenciación celular.

3. En lo que concierne a la actividad antibacteriana de la concha prieta, en este trabajo solo se logró determinar la capacidad de inhibición que poseen los lisados de las células circulantes de este molusco. Sin embargo, no se conoce si esta actividad antibacteriana posee características bactericidas, en esta forma es fuertemente recomendable se diseñen y

realicen experimentos destinados a esclarecer, si esta actividad antibacteriana posee características bactericidas.

4. Uno de los resultados interesantes de este trabajo es la estimación de actividad antibacteriana de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra bacterias de tipo Gram (+) y Gram (-). En este sentido es recomendable determinar la naturaleza biológica de este amplio espectro de acción de esta actividad antibacteriana y establecer si este amplio espectro es el resultado de una adaptación para defenderse de los posibles agentes patógenos del medio en el cual se desarrolla este molusco.

5. Finalmente, este trabajo intenta ser una contribución para proveer de valor agregado a un recurso que tiene un amplio valor comercial en el mercado interno del país, así sería recomendable continuar con trabajos que permitan valorar nuestros recursos naturales. Sobretudo, cuando estos trabajos intentan aportar con nuevos conocimientos sobre la fisiología de organismos poco estudiados como la concha prieta a pesar de ser un producto tradicional en la costa ecuatoriana.

A N E X O S

ANEXO A

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *BACILLUS SP 1* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

Summary Table of Means (new.sta)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	<i>Bacillus sp 1</i>				
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,364	3,000	1,091	0,045	0,002
17092g	0,501	3,000	1,502	0,077	0,006
785g	0,481	3,000	1,443	0,088	0,008
EDTA	0,012	3,000	0,035	0,008	0,000
All Grps	0,339	12,000	4,071	0,212	0,045

Scheffe Test; Variable: *Bacillus sp 1* (new.sta)

Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=.36367	M=.50067	M=.48100	M=.01167
CT (+)			0,144	0,233
17092g		0,144		0,984
785g		0,233	0,984	
EDTA	0,001	0,000	0,000	

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *BACILLUS SP 2* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

Summary Table of Means (new.sta)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	<i>Bacillus sp. 2</i>				
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,970	3,000	2,910	0,091	0,008
17092g	0,478	3,000	1,434	0,017	0,000
785g	0,628	3,000	1,884	0,059	0,003
EDTA	0,040	3,000	0,120	0,052	0,003
All Grps	0,529	12,000	6,348	0,353	0,124

Scheffe Test; Variable: *Bacillus sp. 2* (new.sta)

Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=.97000	M=.47800	M=.62800	M=.04000
CT (+)		0,0000743	0,0009727	0,0000006
17092g	0,0000743		0,0908966	0,0001730
785g	0,0009727	0,0908966		0,0000197
EDTA	0,0000006	0,0001730	0,0000197	

ANEXO C

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *BACILLUS SP 3* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

Summary Table of Means (new.sta)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	<i>Bacillus sp. 3</i>				
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,254	3,000	0,762	0,116	0,014
17092g	0,413	3,000	1,239	0,122	0,015
785g	0,457	3,000	1,371	0,025	0,001
EDTA	0,000	3,000	0,001	0,001	0,000
All Grps	0,281	12,000	3,373	0,200	0,040

Scheffe Test; Variable: *Bacillus sp. 3* (new.sta)

Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=.25400	M=.41300	M=.45700	M=.00033
CT (+)		0,2364906	0,1062699	0,0411598
17092g	0,2364906		0,9376301	0,0026923
785g	0,1062699	0,9376301		0,0013934
EDTA	0,0411598	0,0026923	0,0013934	

ANEXO D

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. ALGINOLYTICUS* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

Summary Table of Means (new.sta)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	<i>V. alginolyticus</i>				
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,628	3,000	1,883	0,016	0,000
17092g	0,594	3,000	1,781	0,081	0,007
785g	0,615	3,000	1,846	0,026	0,001
EDTA	0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps	0,459	12,000	5,510	0,280	0,078

Scheffe Test; Variable: *V. alginolyticus* (new.sta)

Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=.62767	M=.59367	M=.61533	M=0.0000
CT (+)		0,8185360	0,9882490	0,0000009
17092g	0,8185360		0,9423932	0,0000014
785g	0,9882490	0,9423932		0,0000011
EDTA	0,0000009	0,0000014	0,0000011	

ANEXO E

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. HARVEYI* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

Summary Table of Means (new.sta)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	<i>V. harveyi</i>					
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance	
CT (+)		0,243	3,000	0,729	0,010	0,000
17092g		0,011	3,000	0,032	0,009	0,000
785g		0,001	3,000	0,004	0,001	0,000
EDTA		0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps		0,064	12,000	0,765	0,108	0,012

Scheffe Test; Variable: *V. harveyi* (new.sta)

Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.24300	M=.01067	M=.00133	M=0.0000	
CT (+)			0,000	0,000	0,000
17092g	0,000			0,444	0,341
785g	0,000		0,444		0,996
EDTA	0,000		0,341	0,996	

ANEXO F

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. VULNIFICUS* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

Summary Table of Means (new.sta)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	<i>V. vulnificus</i>				
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,267	3,000	0,802	0,023	0,001
17092g	0,261	3,000	0,783	0,051	0,003
785g	0,288	3,000	0,865	0,023	0,001
EDTA	0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps	0,204	12,000	2,450	0,126	0,016

Scheffe Test; Variable: *V. vulnificus* (new.sta)

Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.26733	M=.26100	M=.28833	M=0.0000	
CT (+)			0,995	0,864	0,000
17092g		0,995		0,749	0,000
785g		0,864	0,749		0,000
EDTA	0,000	0,000	0,000		

ANEXO G

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *V. ANGUILLARUM* DE LISADOS DE CÉLULAS CIRCULANTES DE LA CONCHA PRIETA

Summary Table of Means (new.sta)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	<i>V. anguillarum</i>				
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
G_1:1	0,177	3,000	0,530	0,018	0,000
G_2:2	0,096	3,000	0,288	0,002	0,000
G_3:3	0,122	3,000	0,365	0,009	0,000
G_4:4	0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps	0,099	12,000	1,183	0,067	0,005

Scheffe Test; Variable: *V. anguillarum* (new.sta)

Marked differences are significant at $p < .05000$

	{1}	{2}	{3}	{4}
	M=.17667	M=.09600	M=.12167	M=0.0000
G_1:1 {1}			0,000	0,001
G_2:2 {2}	0,000			0,084
G_3:3 {3}	0,001	0,084		0,000
G_4:4 {4}	0,000	0,000	0,000	

BIBLIOGRAFÍA

1. Bachère E., E. Mialhe, D. Noel, V. Boulo, A. Morvan, J. Rodriguez, 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132 17-32
2. Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril., Garnier J., Romestand B., 2004 Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol.*;198:149-168.
3. Conservation of Biodiversity, Marine Park Establishment & Eco-tourism
Ministry of Environment & Forest
Development Project at St. Martin's Island
Bivalves Conservation
4. Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca
Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América
ONU para la agricultura y la alimentación. Roma, 1992

5. González M., Gueguen Y., Desserre G., de Lorgeril J., Romestand B., Bachère E., 2007. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol.*;31(4):332-339.

6. Hill R., Welsh J., 1966. Heart, circulation and blood cells. *Physiology of Mollusca*, Edited by Wilburg K. and Yonge C. New York, Academic Press Inc., 125-174

7. Instituto Nacional de Pesca – Ecuador
Abundancia y estructura poblacional de *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* en las principales áreas de extracción de la costa ecuatoriana
2007

8. Lijima N., Tanimoto N., Emoto Y., Morita Y., Uematsu K., Murakami T., Nakai T., 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysophysin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream *Chrysophryx major*. *European Journal of Biochemistry*. 270: 675-686

9. Loker E, Adema C, Zhang S, Kepler T., 2004. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*. 198: 10-24.

10. Mitta G, Hubert F, Noel T, Roch P., 1999. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem.* 1;265(1):71-78.
11. Mitta G, Hubert F, Dyrinda EA, Boudry P, Roch P., 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev Comp Immunol.*;24(4):381-393.
12. Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P., 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.*, 15;486(3):185-190.
13. Read K., 1966. Molluscan hemoglobin and myoglobobin. *Physiology of Mollusca*, Edited by Wilburg Kand Yonge C. New York, Academic Press Inc., pp. 209-232.
14. Robert D. Barnes, 1989. *Zoología de los invertebrados*. 5ta edición
Clase Bivalvia
pp. 435-509

15. Seo JK, Crawford JM, Stone KL, Noga EJ., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 30;338(4):1998-2004.
16. Tapia F., 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor.
17. Yakovleva N.V., Samoilovich M. P., and Gorbushin A. M., 2001. The diversity of strategies of defence from pathogens in Mollusc, *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 37, (4) 358-367.
18. <http://www.biologiamarina.com/dev/projects/read.asp?pid=10&docid=49>
19. <http://www.educared.net/concurso/254/bivalvos.htm>
20. <http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm>