

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



TÍTULO:

**Desarrollo de una biopelícula antagonica para el control de**

***Flavobacterium psychrophilum***



**Mery Jessi de la Fuente Contreras**

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Concepción, Chile

2013

## AGRADECIMIENTOS

*Doy gracias a Dios por ayudarme a cumplir esta meta, que no sólo es terminar este trabajo y lo que ello implicó, sino dar término a una etapa importante en mi vida. Un agradecimiento especial a mis padres, que gracias a su esfuerzo también he logrado llegar a esta instancia.*

*A mi lindo esposo, que me ha acompañado durante esta aventura del postgrado, entregándome su amor, comprensión, compañía y fuerza en los momentos más difíciles.*

*Le agradezco también al profesor Homero Urrutia quien me permitió trabajar en su laboratorio y me abrió las puertas a la microbiología ambiental.*

*A mis compañeros y compañeras del laboratorio, quienes desinteresadamente me prestaron su ayuda en los momentos que lo necesité y que hicieron que los días transcurridos en el laboratorio fueran más alegres. Agradezco especialmente a José Miguel Vidal, por sus ideas, críticas, consejos y apoyo, que fueron fundamentales para llevar a cabo este proyecto.*

*Quiero agradecer especialmente al Dr. Claudio Miranda, quien se dio el tiempo de ayudarme en mi investigación y publicaciones, sin su ayuda y experiencia no habría conseguido elaborar mis publicaciones y obtener este grado.*

*A todos ustedes, a los que no mencioné, y a las personas que estuvieron y partieron pronto del lab, gracias por todo...*

## Contenido

I. RESUMEN.....	9
II. SUMMARY .....	12
III. INTRODUCCION.....	14
1.- Salmonicultura en Chile .....	14
2.- Enfermedades infecciosas en sistemas acuícolas. Flavobacteriosis .....	15
3.- <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	17
4.- Biopelículas bacterianas .....	20
5.- Métodos tradicionales para el control de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	22
6.- Antagonismo bacteriano.....	23
6.1.-Producción de compuestos de tipo proteico .....	25
6.2.- Producción de sideróforos .....	28
6.3.- Producción de peróxidos.....	31
6.4.- Quorum Sensing y Comunicación Bacteriana .....	34
7.- Interacciones antagónicas entre biopelículas .....	38
8.- Biocontrol en acuicultura.....	40
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	42
V. OBJETIVO GENERAL .....	43
VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	43
VII. MATERIALES Y METODOS.....	44
Actividad 1.1.- Aislamiento bacteriano desde piscicultura y adquisición de cepas .....	45
Actividad 1.2.- Caracterización de la cepa patógena.....	49
Actividad 1.3.- Selección de bacterias antagónicas contra <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	50
Actividad 1.4.- Caracterización de las cepas antagonistas y evaluación de la actividad inhibitoria de sus sobrenadantes .....	52
Actividad 1.5.- Determinación del efecto inhibitorio de sobrenadantes antagónicos sobre la formación de biopelículas de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	53
Actividad 2.1.- Determinación preliminar de la naturaleza química de los compuestos antagónicos en los sobrenadantes .....	55

Actividad 2.2.- Caracterización de actividad inhibitoria del sobrenadante sobre recuentos cultivables y viables de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	58
Actividad 3.1.- Selección del antagonista adecuado y secuenciación del ADNr16s esta bacteria.....	60
Actividad 3.2.- Evaluación del efecto del sobrenadante sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i> en el tiempo.....	61
Actividad 3.3.- Formación y visualización de la biopelícula antagónica.....	61
Actividad 3.4.- Efecto de la biopelícula antagónica sobre la formación de biopelículas de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> en condiciones batch .....	63
Actividad 3.5.- Efecto de la biopelícula antagónica sobre la velocidad de formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i> en condiciones de flujo.....	66
VIII. RESULTADOS.....	69
1.1.- Conformación de un cepario de cepas aisladas de piscicultura .....	69
1.2.- Caracterización fenotípica de la cepa de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	71
1.3.- Caracterización molecular <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	72
1.4.- Crecimiento de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	73
1.5.- Selección de cepas capaces de inhibir el crecimiento de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	74
1.6.- Selección de cepas capaces de bloquear el quorum sensing.....	75
1.7.- Producción de compuestos difusibles con actividad inhibitoria y anti-quorum sensing.....	77
1.8.- Cuantificación de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes .....	78
1.9.- Selección de cepas antagónicas que inhiben la formación de biopelículas de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	79
2.1.- Caracterización bioquímica de las cepas antagonistas seleccionadas .....	81
2.2.- Detección de moléculas señal capaces de bloquear quórum sensing .....	83
2.3.- Detección de sideróforos .....	83
2.4.- Identificación preliminar del tipo de sideróforo producido.....	84
2.5.- Efecto de la producción de sideróforos sobre la inhibición de <i>F. psychrophilum</i> ...	86
2.6.-Determinación de peróxidos .....	87
2.7.- Producción de otro tipo de compuestos con actividad inhibitoria .....	89
2.8.- Termoestabilidad de la actividad inhibitoria .....	90

2.9.- Actividad inhibitoria de los sobrenadantes de bacterias antagónicas sobre el recuento cultivable de <i>F. psychrophilum</i> .....	91
2.10.- Efecto del sobrenadante de las cepas antagónicas sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i> .....	92
3.1.- Caracterización molecular de la cepa antagonista seleccionada.....	95
3.2.- Efecto del sobrenadante en el tiempo sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i> .....	95
3.3.- Formación de la biopelícula antagonista en condiciones batch .....	96
3.4.- Formación de una biopelícula mixta patógeno-antagonista en sistema batch .....	97
3.5.- Formación de una biopelícula antagonista en condiciones de flujo.....	99
3.6.- Formación de biopelículas mixtas antagonista-patógeno en condiciones de flujo	101
IX. DISCUSIÓN .....	104
X. CONCLUSIONES.....	113
XI. REFERENCIAS .....	114



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Producción mundial de salmón y trucha	15
<b>Figura 2:</b> <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	18
<b>Figura 3:</b> Lesión peduncular en un salmón causada por <i>F. psychrophilum</i>	19
<b>Figura 4:</b> Micrografía de una biopelícula de <i>F. psychrophilum</i>	20
<b>Figura 5:</b> Diferentes etapas de formación de biopelículas	21
<b>Figura 6:</b> Estructura de dos bacteriocinas del tipo lantibióticos	26
<b>Figura 7:</b> Modo de acción de las bacteriocinas	27
<b>Figura 8:</b> Estructura de los principales tipos de sideróforos	29
<b>Figura 9:</b> Mecanismo de ingreso de sideróforos en Gram negativos	30
<b>Figura 10:</b> Reacciones enzimáticas que producen ROS	32
<b>Figura 11:</b> Esquema de reacciones que produce daño oxidativo en ADN	33
<b>Figura 12:</b> Sistemas LuxI/R de Quórum Sensing	36
<b>Figura 13:</b> Mecanismos de interferencia en el circuito de señalización bacteriano LuxI/R	37
<b>Figura 14:</b> Estrategia experimental utilizada para el desarrollo de la tesis	44
<b>Figura 15:</b> Diagrama que muestra el sistema instalado para la visualización de la biopelícula antagónica	63
<b>Figura 16:</b> Esquema que muestra la instalación del sistema de flujo para formación de biopelículas	67
<b>Figura 17:</b> Procedencia de las cepas según origen del aislamiento en el pez y en instalaciones de piscicultura	70
<b>Figura 18:</b> Análisis microscópico de las cepas utilizadas en este estudio.	70
<b>Figura 19:</b> Identificación de algunas cepas bacterianas incluidas en este estudio	71
<b>Figura 20:</b> Secuencia de un fragmento de ADNr 16s de <i>F. psychrophilum</i>	73
<b>Figura 21:</b> Curva de crecimiento de <i>F. psychrophilum</i> mediante	74

densidad óptica (*DO*) y recuento en placa

<b>Figura 22:</b> Inhibición de <i>F. psychrophilum</i> mediante ensayo de difusión en agar.	75
<b>Figura 23:</b> Bloqueo quórum sensing evidenciado en cepas sensoras.	76
<b>Figura 24:</b> Actividad antagónica de sobrenadantes liofilizados	77
<b>Figura 25:</b> Inhibición de la adherencia de <i>F. psychrophilum</i> por sobrenadantes antagónicos.	80
<b>Figura 26:</b> Detección de moléculas autoinductoras	83
<b>Figura 27:</b> Detección de sideróforos	84
<b>Figura 28:</b> Espectrograma que muestra el pick de absorción correspondiente a un sideróforo de tipo hidroxamato	85
<b>Figura 29:</b> Detección de sideróforo del tipo hidroxamato mediante el test de tetrazolium.	85
<b>Figura 30:</b> Evaluación de la actividad inhibitoria del sobrenadante FF48 en condiciones saturantes de hierro.	86
<b>Figura 31:</b> Evaluación de la actividad inhibitoria del sobrenadante FF16 en condiciones saturantes de hierro.	87
<b>Figura 32:</b> Detección de producción de peróxidos,	87
<b>Figura 33:</b> Efecto de la catalasa sobre la actividad inhibitoria del sobrenadante FF48 contra <i>F. psychrophilum</i>	88
<b>Figura 34:</b> Efecto de la catalasa sobre la actividad inhibitoria del sobrenadante FF16 contra <i>F. psychrophilum</i>	88
<b>Figura 35:</b> Determinación de la naturaleza bioquímica de compuestos inhibitorios sobre el crecimiento de <i>F. psychrophilum</i> en el sobrenadante FF48	89
<b>Figura 36:</b> Determinación de la naturaleza bioquímica de compuestos inhibitorios sobre el crecimiento de <i>F. psychrophilum</i> en el sobrenadante FF16	90
<b>Figura 37:</b> Efecto de una tratamiento térmico sobre el efecto inhibitorio del sobrenadante FF48 sobre <i>F. psychrophilum</i>	90

<b>Figura 38:</b> Efecto de una tratamiento térmico sobre el efecto inhibitorio del sobrenadante FF16 sobre <i>F. psychrophilum</i>	91
<b>Figura 39:</b> Actividad de los sobrenadantes antagónicos sobre el recuento en fase planctónica de <i>F. psychrophilum</i>	92
<b>Figura 40:</b> Efecto del sobrenadante FF48 sobre la viabilidad de la biopelícula de <i>F. psychrophilum</i> en formación	93
<b>Figura 41:</b> Efecto del sobrenadante FF16 sobre la viabilidad de la biopelícula de <i>F. psychrophilum</i> en formación	93
<b>Figura 42:</b> Efecto del sobrenadante FF48 sobre la fracción cultivable de la biopelícula en formación de <i>F. psychrophilum</i>	94
<b>Figura 43:</b> Efecto del sobrenadante FF16 sobre la fracción cultivable de la biopelícula en formación de <i>F. psychrophilum</i>	94
<b>Figura 44:</b> Secuencia de un fragmento de ADN16r de la cepa FF48	95
<b>Figura 45:</b> Efecto del sobrenadante FF48 sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i>	96
<b>Figura 46:</b> Imagen que muestra las argollas de poliestireno utilizadas y cómo éstas fueron depositadas en matraces para la formación de la biopelícula	96
<b>Figura 47:</b> Micrografía electrónica de la biopelícula antagónica de FF48 a los 3 días de formación.	97
<b>Figura 48.</b> Efecto de la bacteria antagónica sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i> cuando las bacterias son inoculadas al mismo tiempo en sistema batch. Los controles corresponden a las cepas formando biopelículas solas.	98
<b>Figura 49.</b> Efecto de la bacteria antagónica sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i> cuando la biopelícula antagónica es formada previamente en sistema batch.	98
<b>Figura 50:</b> Efecto de una biopelícula antagónica sobre la adherencia de <i>F. psychrophilum</i> mediante PCR tiempo real	99
<b>Figura 51:</b> Visualización de la biopelícula antagónica en condiciones de flujo laminar mediante epifluorescencia.	100
<b>Figura 52:</b> Instalación de un sistema que permite el recambio constante	101

de medio

**Figura 53:** Formación de una biopelícula mixta antagonista-patógeno en condiciones de renovación constante de medio e inoculación simultánea de las cepas. 102

**Figura 54:** Formación de una biopelícula mixta antagonista-patógeno en condiciones de renovación constante de medio con formación previa de la biopelícula antagónica. 103

### INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Listado de las principales enfermedades presentes en cada etapa de desarrollo de salmónidos en Chile	17
<b>Tabla 2:</b> Partidores utilizados en este estudio.	46
<b>Tabla 3:</b> Cepas utilizadas en ensayos de quórum sensing tipo LuxI/R	48
<b>Tabla 4:</b> Condiciones de corrida de qPCR	65
<b>Tabla 5:</b> Caracterización bioquímica cepa 19749 de <i>F. psychrophilum</i>	72
<b>Tabla 6:</b> Cepas aisladas de piscicultura que inhibieron el crecimiento de <i>F. psychrophilum</i>	75
<b>Tabla 7:</b> Cepas que mostraron efecto anti-quorum sensing	76
<b>Tabla 8:</b> Actividad inhibitoria de las cepas antagonistas	76
<b>Tabla 9:</b> Caracterización bioquímica de las cepas antagonistas seleccionadas	82
<b>Tabla 10:</b> Resumen patrones cinéticos de las biopelícula no-especie y mixtas	103

## I. RESUMEN

Chile se ha convertido en uno de los principales productores de salmónes a nivel mundial; sin embargo, las enfermedades infecciosas han surgido con desastrosas consecuencias económicas para el sector. Entre las enfermedades infecciosas, la flavobacteriosis producida por *Flavobacterium psychrophilum*, destaca como una enfermedad de alto impacto en el cultivo de salmón. Se conoce poco de la patogénesis de *F. psychrophilum*, pero la adherencia a agallas e intestino es probablemente el paso inicial de la infección. La adherencia a superficies es también el primer paso para la formación de biopelículas, que corresponden a comunidades microbianas naturales que viven adheridas a superficies como estanques y biofiltros, y protegidas dentro de una matriz orgánica sintetizada por ellas mismas, expresando un repertorio de genes que en muchos casos incrementa su virulencia y las hace persistir en el ambiente.

El tratamiento contra *F. psychrophilum* se basa en el uso de antibióticos; sin embargo, en el último tiempo, la excesiva utilización de estos compuestos ha sido cuestionada tanto por los efectos ambientales y toxicológicos como por la resistencia que presentan los microorganismos y la baja susceptibilidad cuando se encuentran en el estado de biopelículas.

La aplicación de relaciones antagonicas microbianas se presenta como un método alternativo de control eficiente de patógenos y a la vez amigable con el ambiente. Se conoce que entre los principales mecanismos de antagonismo se encuentran la producción de antibióticos y/o bacteriocinas, la producción de peróxidos y la de sideróforos. Estos mecanismos se han estudiado principalmente sobre células en estado planctónico y se conoce poco sobre su efecto en biopelículas. El mecanismo más estudiado en biopelículas involucra la interferencia en el sistema de señalización celular conocido como Quórum Sensing (QS), que también puede evitar la expresión de ciertos genes de virulencia.

En acuicultura, el antagonismo bacteriano es la base para el desarrollo de probióticos y estos ya están siendo utilizados en el cultivo de peces y camarones y pueden ser aplicados en el alimento o al tanque de cultivo con el fin de evitar infecciones con bacterias patógenas y mejorar el crecimiento y desarrollo de estos organismos. Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento probiótico comercial indicado para el

control de *F. psychrophilum* y no se conoce qué efecto puede tener una bacteria antagonista sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

Los probióticos tienen la desventaja que no son capaces de mantenerse en el ambiente y necesitan ser re-aplicados regularmente y en altas concentraciones, por este motivo un tipo de biocontrolador podría ser el diseño de biopelículas antagónicas, las cuales se depositen sobre una superficie con el fin de evitar la adherencia de microorganismos no deseados, sistema que podría ser de utilidad para el control de patógenos en acuicultura. Usando *F. psychrophilum* como patógeno modelo, en esta tesis se desarrolló una biopelícula antagónica para controlar la adherencia de patógenos bacterianos de peces en superficies de piscicultura.

Se analizaron 88 cepas bacterianas aisladas de pisciculturas chilenas las que fueron sometidas a un ensayo de antagonismo contra *F. psychrophilum* mediante el método de difusión en agar y a un ensayo de bloqueo quórum sensing mediante el uso de cepas reporteras. Se evaluó la actividad de cada sobrenadante obtenido desde las cepas antagonistas que resultaron positivas en los ensayos anteriores y el efecto de los sobrenadantes con mayor actividad se evaluó sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. En una segunda etapa se realizó una caracterización preliminar de las moléculas presentes en los sobrenadantes y se realizó la detección de sideróforos, peróxidos y moléculas autoinductoras. Finalmente, en una tercera etapa, se estudió el efecto de la biopelícula del antagonista sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* en un sistema quimiostato, cuantificando las células adheridas de cada especie mediante PCR tiempo real.

Los resultados mostraron que 10,2% de las cepas tuvieron actividad inhibitoria del crecimiento, mostrando 7 de ellas actividad en el sobrenadante. De las 88 cepas, 4 cepas tuvieron actividad anti-QS teniendo sólo una cepa actividad en el sobrenadante ensayado en placas de agar. Los sobrenadantes con mayor actividad fueron los provenientes de cultivos de las cepas FF48, FF16, F6 y FE14 y de estos sobrenadantes los que permitieron la menor formación de biopelículas de *F. psychrophilum* fueron los de las cepas FF48 y FF16. En el caso del sobrenadante FF48 se detectaron sideróforos y un compuesto de tipo proteico; en cambio, en FF16 sólo se detectó sideróforos. FF16 correspondió a *Pseudomonas putida* y FF48 a *Pseudomonas fluorescens*. En una etapa posterior los resultados indicaron que al formar previamente la biopelícula antagónica es

posible evitar la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*, pero no se logra el mismo efecto cuando ambas biopelículas son formadas simultáneamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que la biopelícula antagónica de la cepa FF48 de *P. fluorescens* fue capaz de evitar la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*



## II. SUMMARY

Chile has become one of the largest producers of salmon world-wide, however, infectious diseases have emerged with disastrous economic consequences for the sector. Among infectious diseases, the flavobacteriosis produced by *Flavobacterium psychrophilum* is a high impact disease on salmon farming. Little is known about the pathogenesis of *F. psychrophilum*. The initial stage of infection is probably by adherence to the gills and intestine, which is characteristic of virulence. Adherence to surfaces is also the first stage in the formation of biofilms, which are microbial communities living attached to surfaces as tanks and bio-filtration systems and protected within an organic matrix synthesized by themselves, expressing a repertoire of genes that in many cases increases their virulence. Biofilms are resistant not only to biocides, but they act as reservoirs of pathogens, enabling these to persist in the installations over time.

Treating this infection is based primarily on the use of antibiotics, however, nowadays they have been criticized for their excessive use of both environmental and toxicological effects, as well for the resistance presented by the microorganisms when they are forming biofilms. The application of microbial antagonistic relations is presented as an alternative method to control efficiently the adhesion of pathogens to surfaces, being also environmentally friendly, so the study of this type of bacterial interactions with the physiology of the organism is essential for the design of this technology. It is known that among the mechanisms of antagonism are antibiotic production and / or bacteriocins, production of peroxides and siderophores. These mechanisms have been studied mainly on cells in planktonic state and little is known about their importance in biofilms. The most studied mechanism on biofilms involved interfering with cell signaling system known as quorum sensing.

In aquaculture, bacterial antagonism is the basis for the development of probiotics. These are already being used in fish and shrimp cultivation and can be applied in the feed or the cultivation tank in order to avoid infections with pathogenic bacteria, improving the growth and development of these organisms. At present however, no commercial probiotic treatment exists for the control of *F. psychrophilum* and it is not known what effect an antagonist bacteria can have on the biofilm formation of *F. psychrophilum*.

The disadvantage of probiotics is that they are not self-sustaining in the environment; they therefore need to be re-applied regularly and at high concentrations, for

this reason one type of biocontrol interesting might be the design of an antagonistic biofilm, which are deposited on a surface to prevent adhesion of microorganisms, a system that might be useful for pathogen control in aquaculture. Using as a pathogen *Flavobacterium psychrophilum* model, this thesis aims to develop a biofilm antagonistic to control the adhesion of bacterial pathogens of fish in fish farming areas (general objective).

We analyzed 88 strains isolated from Chilean farms which were subjected to a test of antagonism against *F. psychrophilum* by agar diffusion method and a block quorum sensing assay using reporter strains. We evaluated the activity of the supernatant of the strains which were positive in the above tests and the effect of supernatants with greater activity was evaluated on the adherence of *F. psychrophilum*. In a second stage, a preliminary characterization of the molecules present in the supernatants was performed detecting siderophores, peroxides and autoinducer molecules. Finally, we studied the interaction between the antagonist and biofilm pathogen in a chemostat system by analyzing the kinetics of formation using real time PCR.

The results showed that 10.2% of the strains had growth inhibitory activity, including 7 showing activity in the supernatant. Of the 88 strains, 4 strains had anti-QS activity having only one of them activity in the supernatant tested on agar plates. The most active supernatants were FF48, FF16, FE14 and F6 and these supernatants that allowed less adherence of *F. psychrophilum* were FF48 and FF16. In the case of the supernatant FF48, siderophores were detected and a compound type protein. In contrast, in FF16 only siderophores were detected. FF48 was identified as *Pseudomonas fluorescens* and FF16 as *Pseudomonas putida*. In the last stage of our studies, the results indicated that when the biofilm antagonistic is previously formed is possible to prevent the adhesion of *F. psychrophilum*. This effect is not achieved when both biofilms are formed simultaneously.

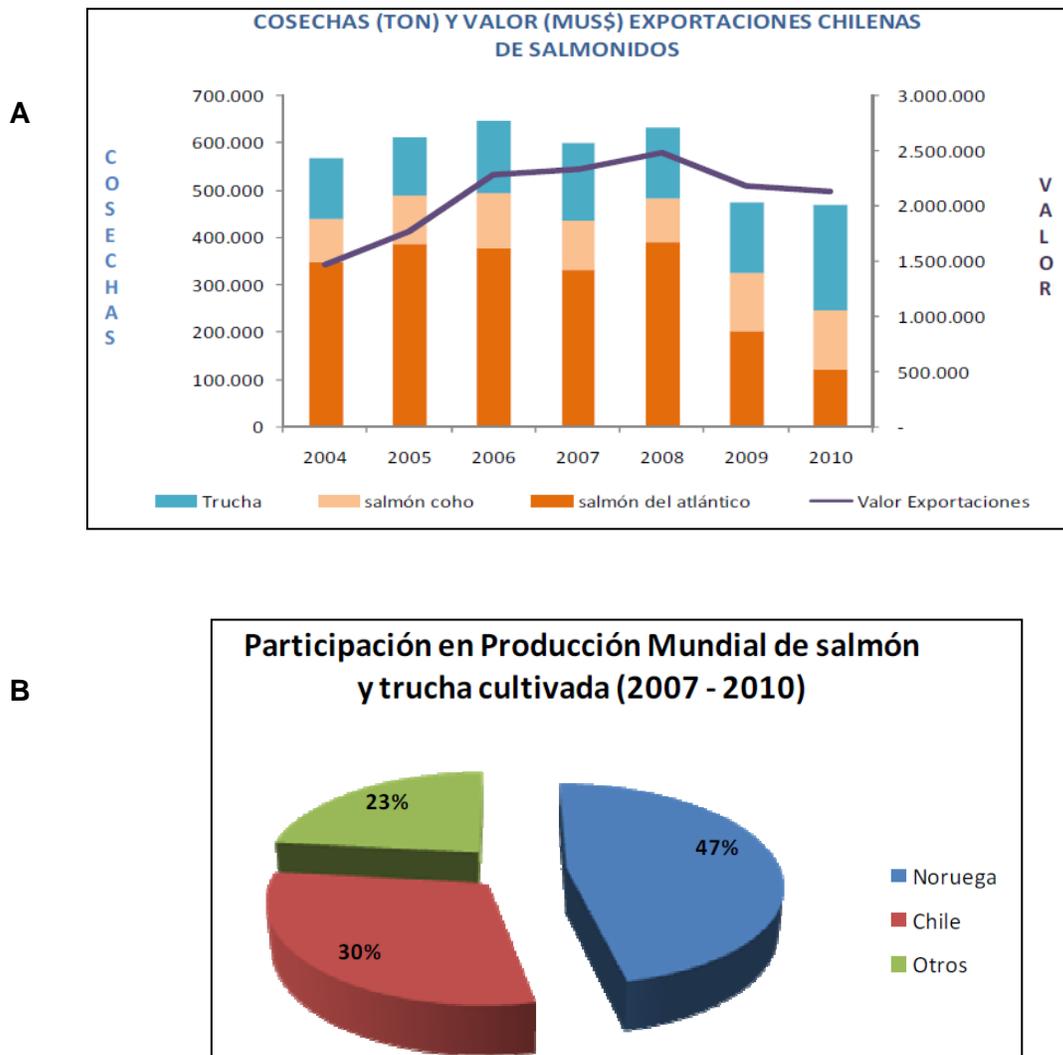
According to the results obtained in this work it is concluded that the biofilm antagonistic strain FF48 of *P. fluorescens* was able to prevent biofilm formation of *F. psychrophilum*

### III. INTRODUCCION

#### 1.- Salmonicultura en Chile

Desde 1992, Chile se ha convertido en el segundo productor de salmónidos en el mundo reportándose en el año 2010 volúmenes de alrededor de 460 mil toneladas de producción bruta y las ventas por exportaciones de salmón y trucha durante el período sumaron US\$ 2.059 millones (SalmónChile, 2011) (Figura 1). Las especies de salmónes de mayor producción corresponden al salmón atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón rey (*Oncorhynchus tshawytscha*). Estas especies se cultivan principalmente en las Regiones X y XI, las que presentan excelentes condiciones naturales para la producción de salmónes. En esta zona del país se creó el Cluster del salmón, con lo que esta actividad industrial genera un gran número de puestos de trabajo (Salgado, 2005).

Con la expansión de la industria acuícola y el aumento en la producción, las enfermedades infecciosas bacterianas y otras producidas por virus y hongos, han emergido con desastrosas consecuencias económicas en este sector, no sólo en Chile sino a nivel mundial. En Chile, durante el año 2002 se produjeron pérdidas evaluadas por US\$ 240 millones, y en el año 2006, la mortalidad de salmónes alcanzó valores de US\$ 400 millones (Alvial y Bañados, 2006), pudiendo considerarse actualmente un importante factor que resta competitividad a nuestro país en este sector productivo.



**Figura 2:** Producción mundial de salmón y trucha. A) Comparación de la producción entre los años 2004 y 2010. Se destaca el aumento sostenido en el tiempo del valor de las exportaciones. B) Gráfico que muestra los principales productores de salmónido en el mundo, donde se destaca a Chile como el segundo a nivel mundial. (Samón Chile 2011)

## 2.- Enfermedades infecciosas en sistemas acuícolas. Flavobacteriosis

Los sistemas de acuicultura generalmente implican un método de cultivo intensivo y un sistema de crianza en confinamiento que genera densas poblaciones de peces. Los desechos orgánicos producidos por los peces son liberados al agua del sistema lo que

estimula el sobre-crecimiento de comunidades patogénicas oportunistas que llevan a infecciones que afectan las distintas etapas del desarrollo de los salmones en cultivo (Tabla 1) (Bravo y col., 2005). Estas etapas incluyen la fertilización de las ovas y luego el crecimiento de alevines a salmones jóvenes (alevinaje-smoltificación), etapa de cultivo que sucede en agua dulce. Así también se puede ver afectada la fase de cultivo en el mar que incluye la engorda y la cosecha.

Entre las enfermedades bacterianas de mayor impacto en cultivo de salmones, se destaca la flavobacteriosis principalmente en agua dulce (Tabla 1), afectando mayoritariamente a las primeras etapas del cultivo. Esta enfermedad constituye al 24,8% de los diagnósticos de laboratorio (Sernapesca, 2011) y puede causar una mortalidad hasta de un 70 % en alevines (Valdebenito y Avendaño-Herrera, 2009). Es producida por los géneros *Flexibacter*, *Flavobacterium* y *Tenacibaculum*, todos ellos patógenos oportunistas. Algunas de las especies involucradas son *Flavobacterium columnare* y *Flavobacterium psychrophilum*, entre otras (Bernardet y Bowman, 2006).

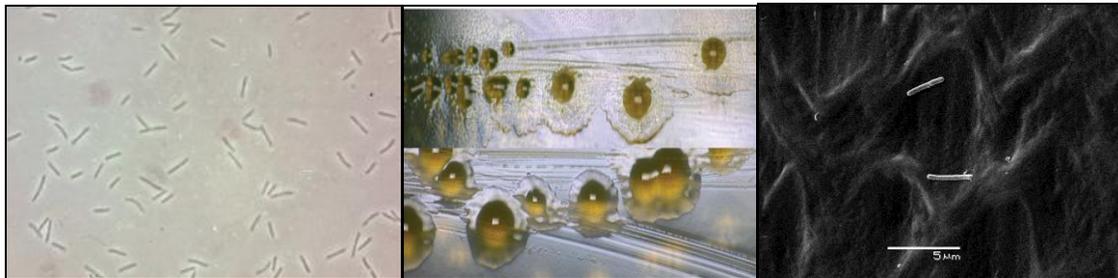


**Tabla 1:** Listado de las principales enfermedades presentes en cada etapa de desarrollo de salmónidos en Chile (extraído de Bravo y col., 2005)

Etapas de Desarrollo	Patologías	
	Fase Agua Dulce	
	Enfermedad	Agente etiológico
Reproductores	Saprolegniosis	<i>Saprolegnia parasitica</i>
	Enfermedad bacteriana del riñón (BKD)	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
	Síndrome Rickettsial del Salmón (SRS)	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
	Virus de la necrosis pancreática infecciosa	Virus IPN
Incubación - alimentación	Saprolegniosis	<i>Saprolegnia parasitica</i>
	Flavobacteriosis	<i>Flavobacterium columnare</i> <i>Flavobacterium psychrophila</i>
	Parásitos	varios
Alevinaje - smoltificación	Saprolegniosis	<i>Saprolegnia parasitica</i>
	Enfermedad bacteriana del riñón (BKD)	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
	Flavobacteriosis	<i>Flavobacterium psychrophila</i> , <i>Flavobacterium columnare</i>
	Yersiniosis	<i>Yersinia ruckeri</i>
	Virus de la necrosis pancreática infecciosa	Virus IPN
Engorda	Parásitos	varios
	Fase Mar	
	Síndrome Rickettsial del Salmón (SRS)	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
	Enfermedad bacteriana del riñón (BKD)	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
	Virus de la necrosis pancreática infecciosa	Virus IPN
	Streptococosis	<i>Streptococcus phocae</i>
	Vibriosis	<i>Vibrio ordalii</i>
Caligus	<i>Caligus</i> sp.	

### 3.- *Flavobacterium psychrophilum*

*F. psychrophilum* es una bacteria que pertenece al phylum *Bacteroidetes*, es un bacilo Gram negativo de amplia distribución ambiental, quimiorganotrofo aeróbico. Microscópicamente se observa como un bacilo curvo y alargado de 0.2-0.75  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.5-7.5  $\mu\text{m}$  de largo. Sus colonias son amarillas de no más de 3 mm de diámetro de borde no definido y su temperatura óptima de crecimiento está entre los 15°C y los 18°C (Cipriano y Holt, 2005) (Figura 2). Es una bacteria calificada como “fastidiosa” por su difícil manejo en laboratorio, se ha descrito que no más del 25% de las células presentes en cultivo son capaces de producir colonias en placas de agar (Michel y col., 1999).



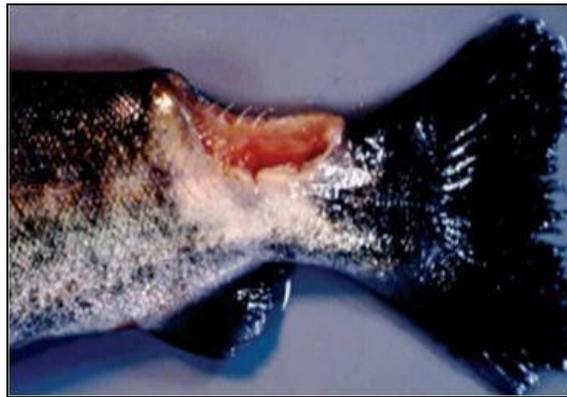
**Figura 3:** *Flavobacterium psychrophilum* A) Imagen microscópica que muestra la forma celular B) Imagen macroscópica que muestra el color y forma de las colonias C) Micrografía electrónica de barrido. (Cipriano y Holt, 2005)

Este patógeno es considerado uno de los agentes infecciosos de salmónidos más importantes a nivel mundial, dada la alta tasa de mortalidad causada por la infección, el aumento de susceptibilidad a otras enfermedades, gastos en quimioterapia y el resultante impacto económico en acuicultura (Nematollahi y col., 2003). En Noruega en el año 2011 se reportó un 90% de mortalidad en trucha arcoíris debido a este patógeno (Nilsen y col., 2011). En el ámbito nacional, *F. psychrophilum* corresponde a la flavobacteria patógena más importante del total de los diagnósticos de laboratorio (SernaPesca, 2011). *Flavobacterium psychrophilum* es fácilmente transmitido vía horizontal a través del contacto con el agua (Madetoja y col., 2000). La bacteria es parte de la flora asociada a la piel, mucus y tejido conectivo (Nematollahi y col., 2003) y puede sistemáticamente invadir hospedadores que han sido comprometidos por condiciones ambientales desfavorables. En salmónidos adultos ocasiona extensas lesiones necróticas resultando en el cuadro clínico denominado “enfermedad del agua fría” y en peces juveniles produce una infección septicémica aguda denominada “Síndrome del alevín de trucha arco iris” (Cipriano y Holt, 2005).

Se conoce poco de la patogénesis de *F. psychrophilum*, la adherencia probablemente es el paso inicial de la infección y la habilidad de aglutinar y hemolizar eritrocitos de trucha arcoiris podría explicar, al menos parcialmente, la severa anemia que ocurre en los peces infectados. Se ha encontrado que las lectinas de unión a ácido salicílico están involucradas en la hemaglutinación exhibida por cepas de *F. psychrophilum* perteneciente a algunos serotipos. Las proteasas extracelulares y la condroitina liasa son importantes factores de virulencia, los cuales pueden explicar en algún grado las extensas lesiones necróticas observadas en peces enfermos (Figura 3).

Entre las capacidades proteolíticas, la degradación de elastina, en particular, ha sido sugerida como factor de virulencia, dado las altas tasas de mortalidad observadas en truchas al ser infectadas con una cepa con capacidad elastasa en comparación con una elastasa negativa. Además se ha encontrado que la capacidad lítica es una ventaja que indirectamente contribuye a su virulencia (Bernardet y Bowman, 2006; Barnes y Brown, 2011).

La presencia de adhesinas y exopolisacárido se ha sugerido que permiten la adhesión a las células hospedadoras (Cipriano y Holt, 2005)



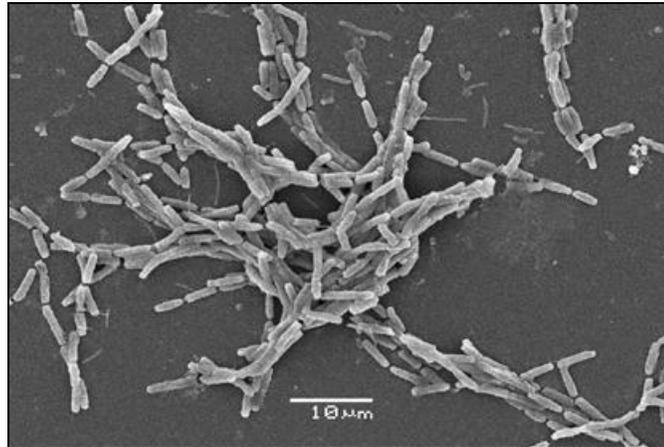
**Figura 4:** Lesión peduncular en un salmón causada por *F. psychrophilum*

Después que penetra la dermis se esparce a través del tejido conectivo colagenoso, por el cual tiene elevada afinidad y posteriormente se expande en la musculatura. Se crean úlceras abiertas con las consecuentes lesiones en los órganos internos. Además suprime fuertemente el sistema inmune humoral de pez infectado (Barnes y Brown, 2011).

*F. psychrophilum* tiene al menos tres serotipos y linajes genéticos diferentes, existiendo variaciones en la virulencia de estas cepas; esta virulencia también puede ser especie-específica con respecto a los peces (Barnes y Brown, 2011).

Se ha descrito que *F. psychrophilum* es capaz de formar biopelículas en densidades mayores a  $10^7$  ufc/ml y que éstas son menos susceptibles a agentes antimicrobianos, pudiendo seleccionarse rápidamente células resistentes a

concentraciones subinhibitorias de antibióticos (oxitetraciclina y flumequina) (Sundell y Wiklund, 2011) (Figura 4)

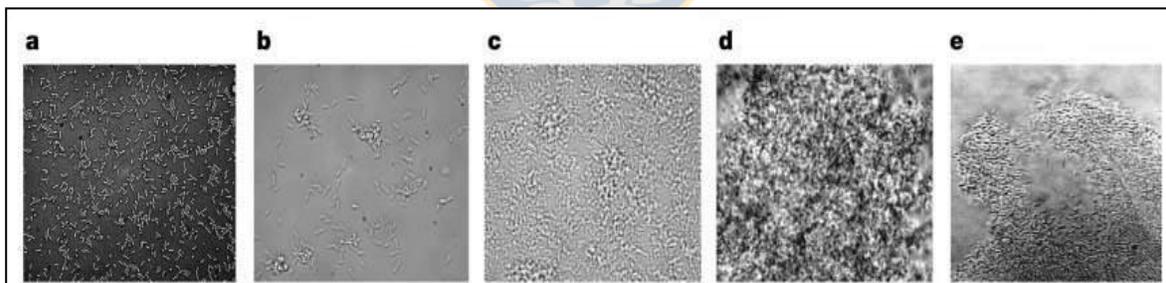
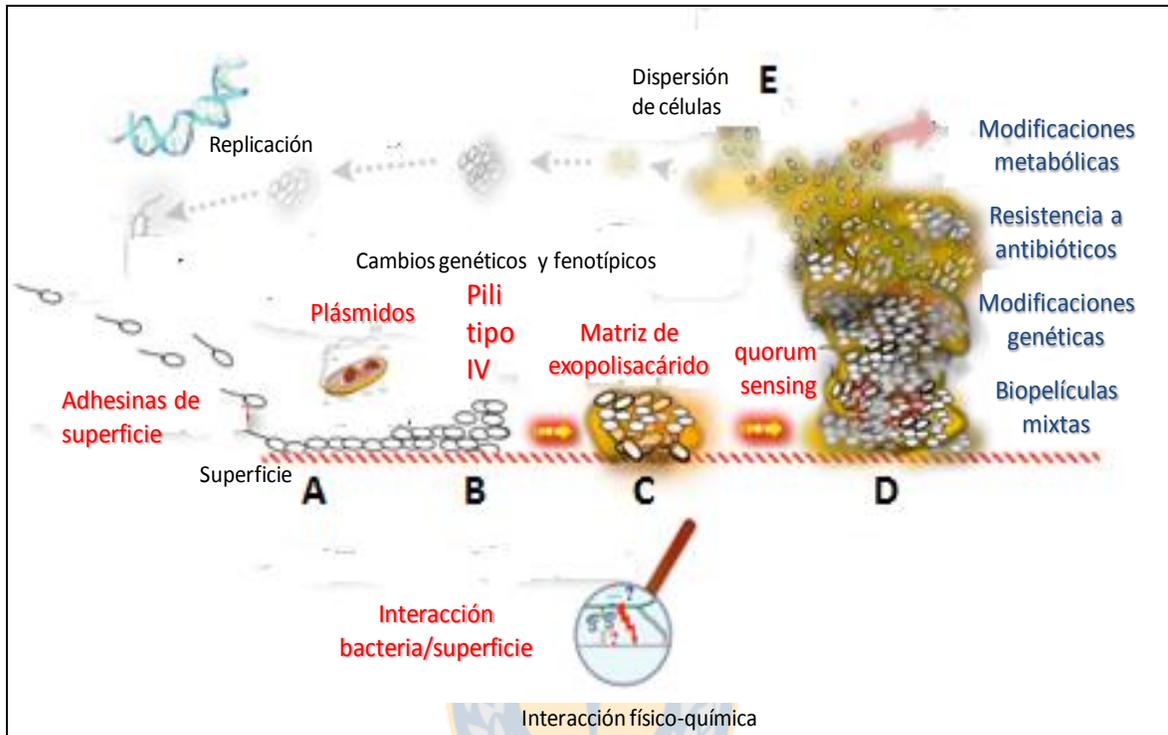


**Figura 4:** Micrografía electrónica de barrido de una biopelícula de *Flavobacterium psychrophilum* (Morgan y col., 2009)

#### 4.- Biopelículas bacterianas

El medio ambiente cumple una función trascendental en modular la expresión de propiedades fenotípicas y con ello la intensidad de daño que un patógeno puede expresar. Esto es especialmente cierto en los microorganismos que desarrollan su vida sobre superficies (interfases líquido/sólido; gas/sólido; gas/líquido). Esta forma de vida, llamada genéricamente biopelícula microbiana, posee características propias, tales como ser particularmente activas, resistentes a antimicrobianos (antibióticos, biocidas) y difíciles de pesquisar por métodos tradicionales, porque una importante proporción de los microorganismos que la componen se encuentran en un estado de baja actividad celular (Dingding y Parsek, 2007).

La formación de biopelículas incluye varias etapas, en primer lugar las células planctónicas comienzan adhiriéndose a una superficie de manera reversible formando una monocapa con la ayuda de adhesinas de superficie e interacciones fisicoquímicas. Luego comienza la producción de matriz extracelular que incluye una adherencia irreversible a la superficie para formar microcolonias, posteriormente comienza el desarrollo temprano de una estructura de biopelícula seguida de la maduración final de biopelícula y la dispersión de algunas células para dar origen a nuevas biopelículas (Sauer y col., 2002) (Figura 5)



**Figura 5:** Diferentes etapas en la formación de una biopelícula. A) Adherencia reversible B) Adherencia irreversible C) Maduración I D) Maduración II E) Dispersión.

<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Ggb/index.html>

Durante el proceso de adhesión, las células microbianas alteran sus fenotipos en respuesta a la proximidad de superficie, como por ejemplo, cambios morfológicos o la alteración de la expresión génica, lo cual les confiere características propias tales como alta heterogeneidad metabólica y fisiológica que las hace particularmente activas y

resistentes a antimicrobianos (Stewart y Franklin, 2008; Sadovskaya y col., 2010). Las biopelículas pueden responder de manera diferente a una desinfección, debido al aumento en la producción de polímeros extracelulares. El glicocálix y las células periféricas reaccionan con los antimicrobianos químicamente reactivos y actúan como secuestrador de biocidas. De igual forma, la aplicación de antimicrobianos puede incrementar la adhesión de biopelículas microbianas (Stewart y Costerton, 2001; Mah y O'Toole, 2001).

En acuicultura las biopelículas se presentan en redes de alimentación de agua, superficies de estanques, incubadores, componentes de equipos, sistemas de bio-filtración, incluyendo superficies internas/externas de peces, materia en suspensión entre las cuales se encuentran coliformes, especies de *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas* y *Vibrio* que han sido reportadas formando biopelículas adheridas a diferentes tipos de materiales en tanques de cultivo de alevines y "smolts". También las biopelículas pueden servir como soporte para el asentamiento de otros microorganismos como microalgas y protozoos, proceso denominado como "biofouling". Se ha encontrado que el acantonamiento de patógenos de peces afecta la depuración del agua en sistemas de recirculación teniendo un significativo impacto en la salud de peces y ambiente (King y col., 2004).

##### **5.- Métodos tradicionales para el control de *Flavobacterium psychrophilum***

El tratamiento contra esta infección se basa principalmente en el uso de antibióticos como oxitetraciclina, amoxicilina, flumequina y ácido oxolínico. Sin embargo, no es un método de control totalmente satisfactorio considerando que *Flavobacterium psychrophilum* puede presentar resistencia a los antimicrobianos (Del Cerro y col., 2010) y que el uso excesivo de antibióticos en acuicultura ha sido cuestionado por sus efectos ambientales, ecológicos y toxicológicos (Cabello, 2006).

En Chile desde 1999 al año 2003, la razón de administración de antimicrobianos se incrementó a más del doble (0,29 hasta 0,676 kg de antibiótico/tonelada de salmón) (Bravo y col., 2005), lo que hizo necesario implementar medidas de control que llevaron a la estabilización de su uso entre los años 2005 y 2009 (0,4 y 0,5 kg de antibiótico/tonelada de salmón respectivamente) (Sernapesca, 2011).

Actualmente se conoce que el uso y abuso de estas sustancias tanto en medicina como también en la acuicultura para el control de las infecciones incrementa la presión selectiva ejercida sobre las bacterias que resulta en la proliferación de cepas resistentes que a su vez pueden transferir sus genes de resistencia a otras bacterias susceptibles en el ambiente (González y col., 2004). Aún el uso de concentraciones bajas de antibióticos subterapéuticos o llamadas también profilácticas, pueden seleccionar resistencia cruzada a antibióticos usados en medicina humana siendo un potencial peligro. Por estos motivos, aunque los antibióticos resulten útiles en una primera instancia, a largo plazo llevan a problemas aún mayores que los que motivaron su uso inicialmente (Verschuere y col., 2000).

Otro problema que se genera por la aplicación de antibióticos para el control de patógenos es que éstos no son efectivos cuando las bacterias están en biopelículas, siendo en la mayoría de los casos casi 1000 veces más tolerantes que las células planctónicas a estas sustancias (Breidenstein y col., 2011). La Food and Agriculture Organization (FAO 2010) y la Organización Mundial de la Salud (OMS 2003) han recomendado reducir el uso inapropiado de antibióticos, enfatizando el manejo de las infecciones a través de la prevención, ya que optimiza la relación costo-beneficio del proceso productivo.

Es por ello que la legislación chilena ha restringido desde el año 2001 el uso de antibióticos para medidas profilácticas (Reglamento Sanitario de la Acuicultura D.S. N° 319-01) y sólo pueden ser prescritos para tratamiento por un médico veterinario, correspondiendo al registro de antibióticos autorizados en el SAG.

Con respecto a la vacunación, varios intentos han sido realizados pero actualmente aún no existe una vacuna comercial efectiva.

## **6.- Antagonismo bacteriano**

La resistencia a antibióticos junto a los efectos toxicológicos de estos compuestos, ha hecho estudiar con mayor interés alternativas de tratamiento basadas en biocontrol, explotando el antagonismo que ejercen determinados microorganismos contra patógenos (Maeda y col., 1997).

El antagonismo entre bacterias es un fenómeno bastante común en la naturaleza mediante el cual se produce la inhibición de una bacteria por los productos de otra (Barton

y Northup, 2011), lo cual es conocido también como amensalismo. Este fenómeno está basado en diferentes mecanismos dependiendo de la especie bacteriana.

Entre los géneros bacterianos descritos como antagonistas de patógenos de peces en la microbiota intestinal se puede mencionar *Pseudomonas* sp., *Photobacterium* sp., *Bacillus* sp., y *Vibrio* sp. (Shakila y col., 2006). Con respecto a *F. psychrophilum*, la mayoría de los estudios de antagonismo indican que el género *Pseudomonas* sería su principal inhibidor a través de sideróforos tanto en ensayos bacteria-bacteria como sobrenadante-bacteria (Kei y col., 2006, Tirola y col., 2002; Ström-Bestor y Wiklund, 2011; Korkea-aho y col., 2011). En *Pseudomonas* sp. los mecanismos de antagonismo incluyen además de sideróforos, la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas (Parret y col., 2003). En otros géneros bacterianos aislados de peces como *Vibrio* sp. (Gatesoupe, 1997) y *Bacillus* sp. (Naclerio y col., 1993; Wilson y col., 2006) también se han descrito múltiples mecanismos de antagonismo contra patógenos de peces.

Las interacciones antagónicas sobre *F. psychrophilum* se han estudiado solamente en fase planctónica (Ström-Bestor y Wiklund 2011; Kei y col., 2006; Robertson y col., 2000). Sin embargo, las biopelículas también pueden desarrollar una variedad de interacciones con especies vecinas (Moons y col., 2009). Se han estudiado mecanismos de antagonismo entre células bacterianas que puedan ser capaces de inhibir biopelículas (Defoird y col., 2011; Moons y col., 2009; Mireles y col., 2001) y algunos productos extraídos desde bacterias antagónicas y otros sintéticos con potencial anti-biopelículas como enzimas (Leroy y col., 2008), inhibidores de quórum sensing (Rasmussen y col., 2005) y otros compuestos que interfieren con la formación de biopelículas como los sideróforos (Singh y col., 2002; Banin y col., 2006).

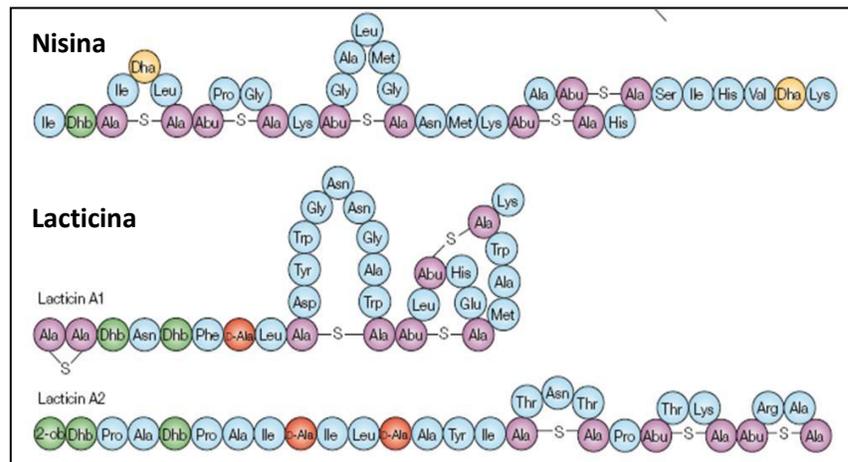
A continuación se describen los mecanismos de antagonismo que han sido relacionados con la inhibición de la formación de biopelículas en otras especies principalmente en *Pseudomonas* sp., entre ellos se puede mencionar síntesis de bacteriocinas y enzimas, producción de sideróforos, generación de peróxidos e interferencia con circuitos de señalización celular (Rao y col., 2005; Eberl y Collinson, 2009; Kristensen y col., 2008; Defoirdt y col., 2011), todos ellos con potencial inhibidor sobre biopelículas.

### 6.1.-Producción de compuestos de tipo proteico

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos y proteínas con propiedades antimicrobianas. Su síntesis es ribosomal como el común de las proteínas. Las bacteriocinas han sido estudiadas principalmente en *Lactobacillus* sp. y en bacterias Gram positivas aunque se ha sugerido que el 33 al 99% de bacterias y archeas produce al menos una bacteriocina. Pueden ser encontradas en bacterias Gram positivas o negativas, algunos ejemplos son colicina producida por *E. coli* (Gram negativa), brevicina producida por *Lactobacillus brevis* (Gram positiva), nisina producida por *Lactococcus lactis* (Gram positiva) y pediosina producido por *Pediococcus pentosaceus* (Gram positiva) (Cotter y col., 2005).

En *Lactobacillus* sp. las bacteriocinas se han clasificado en tres clases, la clase I corresponde a los lantibióticos, la clase II que corresponde a los no-lantibióticos y la clase III que corresponde a hidrolasas termosensibles llamadas bacteriolisinas (Cotter y col., 2005).

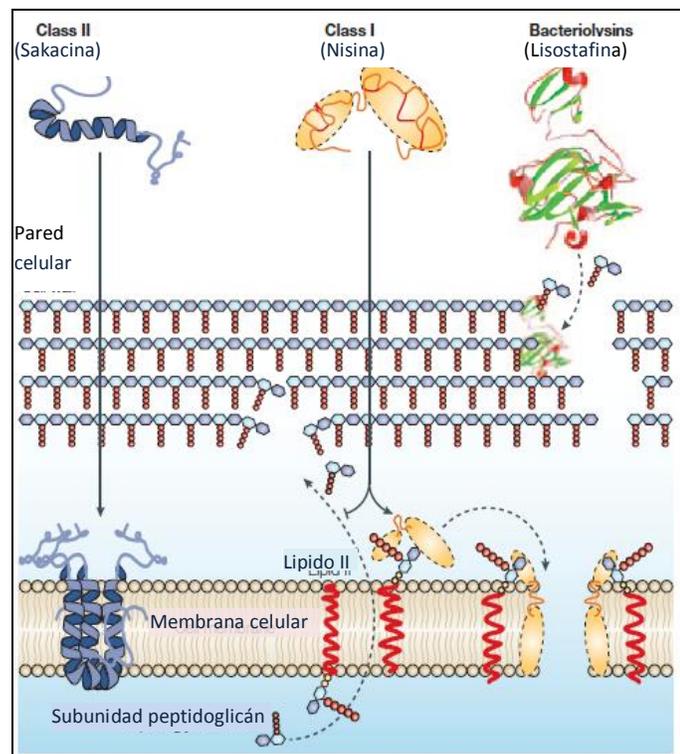
Los lantibióticos son pequeños péptidos de 19 a 38 aminoácidos que poseen un residuo de lantionina epónima o beta-metillantionina, también pueden contener otros aminoácidos inusuales que resultan de modificaciones post-traduccionales (Figura 6). El mecanismo de acción de los lantibióticos catiónicos, como la nisina, consiste en la formación de poros llevando a la disipación del potencial de membrana y al eflujo de pequeños metabolitos desde la célula susceptible. Los lantibióticos globulares, como la mercasidina, en cambio, actúan a través de inhibición enzimática de la síntesis de peptidoglicán. Es importante destacar que algunos lantibióticos pueden tener más de un mecanismo de acción, por ejemplo la nisina además de la formación de poros es capaz de evitar la síntesis de peptidoglicán uniéndose al lípido II, que es el encargado de transportar subunidades de peptidoglicán a la pared (Hsu y col., 2004).



**Figura 6:** Estructura de dos bacteriocinas del tipo lantibióticos. En el caso de la lacticina 3147 son dos péptidos actuando de forma sinérgica (Cotter y col., 2005)

Los no-lantibióticos son pequeños (<10kDa), termoestables y a diferencia de los lantibióticos no sufren modificaciones post-traduccionales. Esta clase de bacteriocinas por su estructura de hélice anfipática se insertan en la membrana provocando la despolarización y afectando así la permeabilidad de la membrana con la subsecuente liberación de moléculas desde la bacteria blanco. La heterogeneidad de este grupo hace difícil su clasificación pero la mayoría de las clasificaciones incluyen la clase IIa tipo pediocina y la clase IIb correspondiente a bacteriocina de dos péptidos. Estudios han sugerido que la clase IIa se une a una permeasa en la membrana para realizar su acción. La clase IIb requiere la coordinación de los dos péptidos para producir la disipación del potencial de membrana que provoca la pérdida de iones y/o ATP (Ennahar y col., 2000).

Las bacteriolisinas (clase III) son proteínas antimicrobianas más grandes y termosensibles. Su mecanismo de acción es la lisis de las células susceptible catalizando la hidrólisis de la pared celular. A diferencia de los otros grupos no tienen genes de inmunidad específica que acompañen los genes estructurales de la bacteriocina en el operón que las codifica (Cotter y col., 2005).



**Figura 7:** Modo de acción de las bacteriocinas según la clasificación en bacterias ácido-lácticas (Cotter y col., 2005)

Además del conocido mecanismo de formación de poros en la membrana celular de las bacteriocinas (Figura 7), se ha descrito también que estas bacteriocinas pueden llegar a tener una actividad nucleasa (ADN, ARNm, ARNt) (Cotter y col., 2005).

Las bacteriocinas producidas por una bacteria puede ser activa contra la misma especie (reducido espectro) o contra otras especies (amplio espectro), aunque frecuentemente son efectivas contra especies del mismo grupo Gram. Los microorganismos productores son inmunes a su propia bacteriocina(s), una propiedad que es mediada por proteínas de inmunidad específica (Cotter y col., 2005). Además del conocido efecto antagónico, las bacterias productoras de bacteriocinas modifican su estrategia antibiótico a probiótico dependiendo del ambiente (Guillor y col., 2008).

Con respecto a su relación con la formación de biopelículas, el efecto antibiótico de las bacteriocinas en algunos casos puede actuar al interior de una biopelícula (Tait y Sutherland, 2002) pudiendo matar bacterias e incluso causar el desprendimiento de ellas (Nel y col., 2002).

En los últimos años se ha acrecentado el interés por el estudio de bacteriocinas, en primer lugar por su función en la regulación de la dinámica de la población en

ecosistemas bacterianos, favoreciendo la competencia y colonización de ambientes y las aplicaciones que éstas pueden tener, por ejemplo, en la preservación de leche, carne y vegetales inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas (Cotter y col., 2005).

Las enzimas son otros compuestos proteicos que han sido propuestos para el control de biofouling y algunas de ellas afectan particularmente a la formación de biopelículas. Estas enzimas pertenecen a los grupos oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas y liasas. Los mecanismos de estas enzimas para evitar la formación de biopelículas incluyen glucosidasas que pueden degradar oligo o polisacáridos relacionados con la adherencia pero que no serían efectivas contra polisacáridos complejos como los exopolisacáridos que forman parte de la matriz de las biopelículas (Kristensen, 2008). Proteasas comerciales (Leroy, 2008) y mezclas de liasas e hidrolasas también comerciales han mostrado efecto contra la matriz de exopolisacáridos. La alginasa de origen bacteriano es un tipo de liasa que es capaz de degradar el policárido alginato, componente importante de la matriz en algunas especies como *P. aeruginosa* (Manyak y col., 2005). Otras enzimas han mostrado también capacidad para interrumpir la comunicación intercelular durante la colonización de la superficie como las AHL-acilasas, que degradan un tipo de molécula señal.

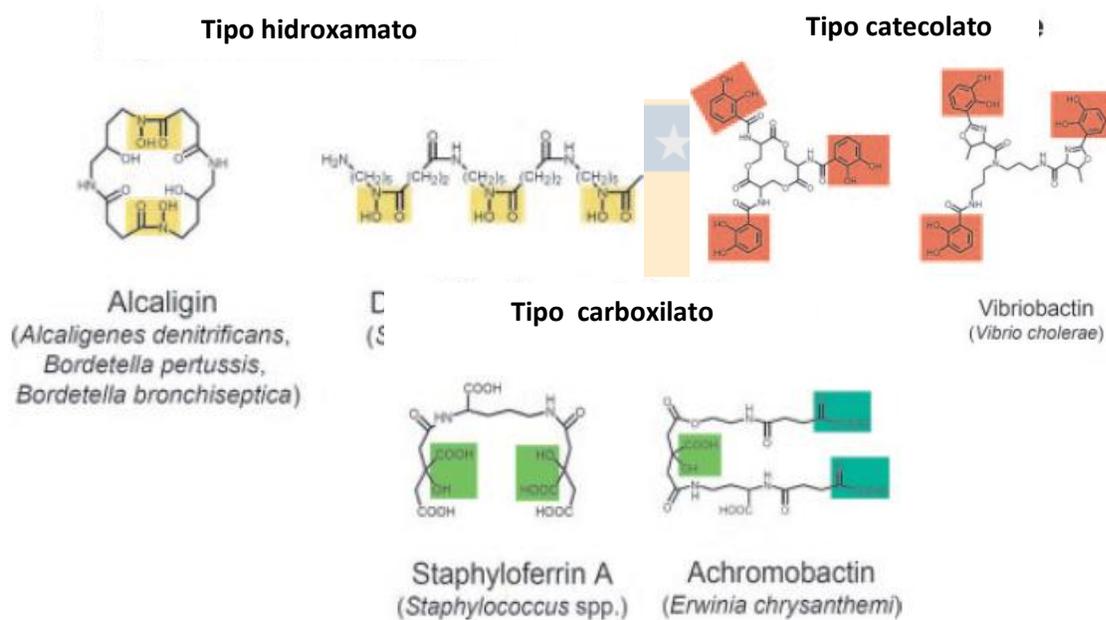
## 6.2.- Producción de sideróforos

Todos los microorganismos requieren del hierro para su crecimiento y en este sentido algunas bacterias producen agentes quelantes de hierro de bajo peso molecular (menor a 1000 Da) llamados sideróforos, con alta afinidad para capturar Fe (III) y lo hacen disponible para el crecimiento microbiano. Una vez en el citoplasma se produce la liberación de hierro de los sideróforos por una reducción de Fe (III) a Fe (II) catalizado por la ferri-sideróforo ferrereductasa, ya que la afinidad del Fe (II) es menor, o también puede ocurrir la hidrólisis del sideróforo (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003)

El gen *fur* o su análogo, se encuentra en todas las especies bacterianas que han sido secuenciadas, es el encargado de regular las proteínas encargadas de la captación de hierro y de almacenamiento y uso de hierro dependiendo de la concentración intracelular de este elemento. La proteína Fur (*ferric uptake regulation*) es la encargada de regular la expresión de genes implicados en la captación de hierro. Actúa como un represor que reconoce una secuencia de ADN, denominada Caja Fur, presente en la región operadora de los genes que pertenece al regulón Fur. El reconocimiento ocurre cuando la proteína Fur forma un complejo con Fe II, por lo cual la transcripción de estos

genes se bloquea en presencia de hierro y así se inhiben los procesos de captación almacenamiento y uso de hierro (Hantke, 2001).

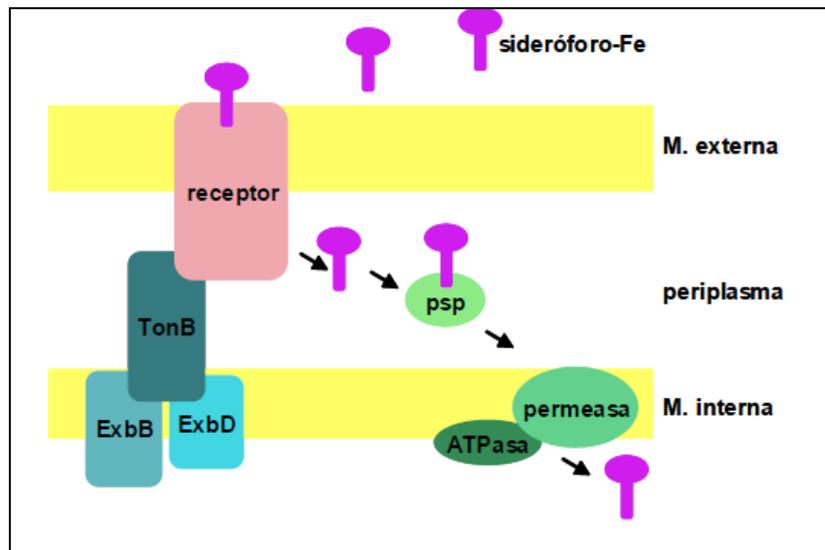
La estructura de los sideróforos así como la biosíntesis puede variar según las diferentes especies, sin embargo, se coincide que hay tres tipos de sideróforos según su estructura y los grupos quelantes que poseen (Figura 8). Los hidroxamatos, poseen ácidos hidroxámicos en su estructura, los catecolatos contienen anillos catecol y los carboxilatos contienen grupos hidroxácidos (Miethke y Marahiel, 2007).



**Figura 8:** Estructura de los principales tipos de sideróforos con sus grupos funcionales

La biosíntesis de sideróforos no es ribosomal y es realizada por sintetasas de péptidos citoplasmáticas. Los genes que codifican para estas sintetasas son reguladas por hierro y Fur y a menudo se encuentran en clusters con genes codificantes para receptores de sideróforos. Luego de sintetizados los sideróforos son excretados de la célula e internalizados nuevamente siendo reconocidos por receptores de membrana (Wandersman y Depelaire, 2004), que son dependientes energéticamente del complejo TonB-ExbB-ExbD en bacterias Gram negativas (Figura 9). El transporte a través de la

membrana citoplasmática se realiza a través de una proteína periplasmática, la cual experimenta un cambio conformacional cuando se une al sustrato, esto facilita su reconocimiento por una permeasa. La permeasa extrae el ligando y lo transporta a través de la membrana usando la energía proporcionada por una hidrolasa de ATP. La hidrólisis no se realiza hasta que la enzima interacciona con la proteína periplasmática cargada con el ligando evitando así un consumo innecesario de ATP (Chakraborty y col., 2007). En bacterias Gram positivas el transporte a través de la membrana citoplasmática es realizado a través de un transportador del tipo ABC.



**Figura 9:** Mecanismo de ingreso del sideróforo en una bacteria Gram negativa. El sideróforo solubiliza el hierro y el complejo ferri-sideróforo es ingresado al citoplasma a través de una permeasa.

El significado ecológico de los sideróforos reside en su capacidad para capturar un nutriente esencial del medio y privar a los competidores de él, en un ambiente en el cual el hierro es escaso como en los tejidos y fluidos corporales del hospedador (Wooldridge y Williams, 1993). Se conocen más de 500 sideróforos en bacterias Gram negativas y positivas (Wandersman y Depelaire, 2004). De la misma manera también se ha encontrado producción de sideróforos en patógenos de peces como *Aeromonas salmonicida* (Fernández y col., 1998). Se ha descrito que *F. psychrophilum* es capaz de crecer en condiciones limitantes de hierro y es capaz de producir sideróforos o sustancias tipo sideróforos, siendo capaz de restablecer su crecimiento inhibido por la restricción de

hierro (Møller y col., 2005). Sin embargo, se ha indicado que la eficiencia de adquisición de hierro comparado con otros patógenos de peces sería baja (Ström-Bestor y Wiklund, 2011).

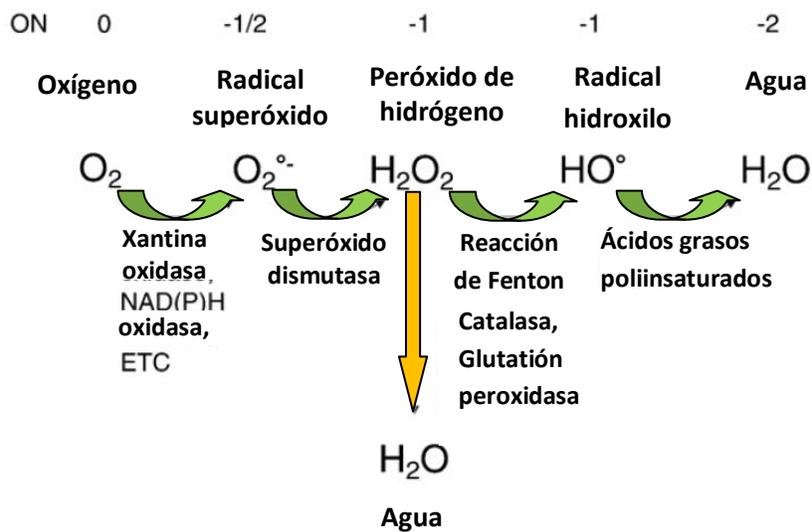
Se ha encontrado que cepas marinas de *Streptomyces* producen sideróforos e inhiben *in vitro* el crecimiento de *Vibrio spp.*, estudio que mostró que los *Streptomyces* pueden ser promisorios agentes de biocontrol en acuicultura (You y col., 2005, 2007).

La función del hierro y así de los sideróforos va más allá de la sobrevivencia básica. El hierro tiene una función estructural determinando la formación de biopelículas. Tanto la ausencia de hierro como el exceso pueden llevar a una inhibición de la formación de biopelículas, existiendo para cada especie un intervalo de concentración óptima de hierro que maximiza el establecimiento y desarrollo de la biopelícula, cuando se está fuera de este rango la bacteria tiende sólo a existir en forma planctónica (Musk y col., 2005; Rowe y col., 2010; Berlutti y col., 2004). Se ha encontrado que mutantes que no producen sideróforos son deficientes en la formación de biopelículas (Banin, 2005; Harrison y Bruckling, 2009), así también al usar un quelador como EDTA se produce la dispersión de biopelículas en *P. aeruginosa* (Banin, 2006). Los sideróforos han sido propuestos como un mecanismo de inmunidad en secreciones humanas externas que evitan el desarrollo de biopelículas de *P. aeruginosa* (Singh y col., 2002). Hay evidencia de que los sideróforos podrían participar también como mecanismo de antagonismo cuando las bacterias forman biopelículas (Eberl y Collinson, 2009; Ishida y col., 2011).

### **6.3.- Producción de peróxidos**

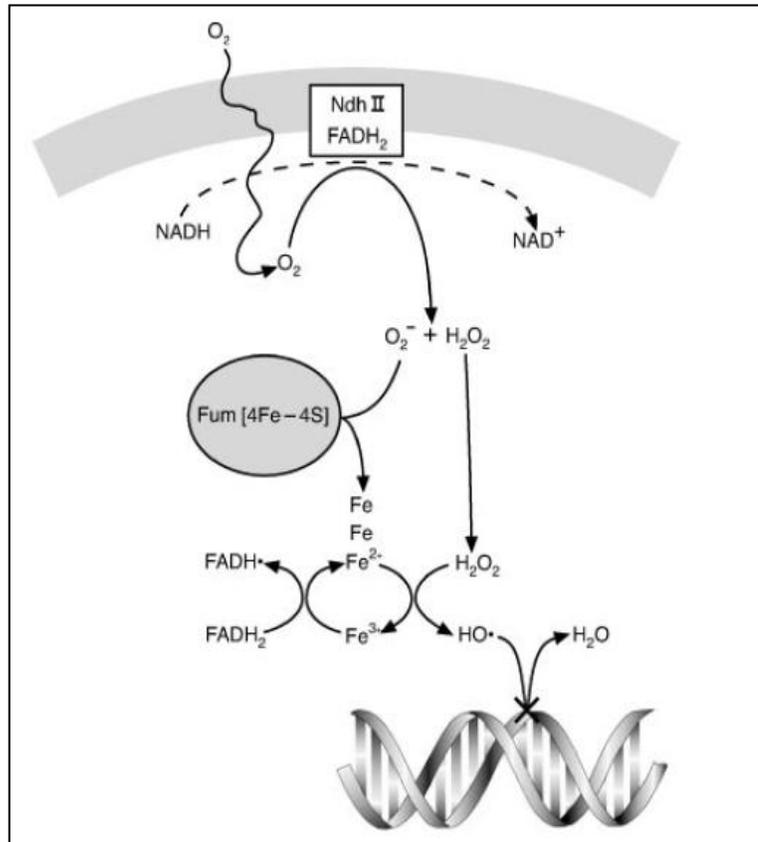
El peróxido de hidrógeno generado por muchas especies bacterianas resulta tóxico para microorganismos Gram positivos y negativos que carecen o tienen bajos niveles de enzimas detoxificantes que descomponen peróxido como la catalasa y peroxidasa (Imlay, 2003).

El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva del oxígeno (ROS), generado como producto del metabolismo aeróbico. Tiene propiedades oxidantes y reductoras y recientemente se le ha atribuido una función de señalización. El peróxido de hidrógeno es una molécula quiral con un dipolo permanente, no es una molécula radical a diferencia de otras ROS y es relativamente estable en condiciones fisiológicas aunque se puede convertir a otras ROS por una serie de enzimas (Bienert y col., 2006) (ver Figura 10).



**Figura 10:** Reacciones enzimáticas consecutivas que producen las especies reactivas del oxígeno. La reducción a agua ocurre no enzimáticamente. ON: número de oxidación, ETC: cadena transportadora de electrones.

El peróxido de hidrógeno es capaz de afectar el estado redox intracelular actuando sobre los sistemas oxido reducción como NAD(P)H/NAD<sup>+</sup>, tioredoxina/tioredoxina oxidada y proteína-SH/proteína-SS-R (Imlay, 2003). El cambio en el estado redox afecta el ambiente fisiológico y en consecuencia la funcionalidad de un amplio rango de proteínas. El peróxido de hidrógeno también puede realizar modificaciones en algunas proteínas como oxidación de residuos de metionina o los grupos tiol de las cisteínas (Imlay, 2003). Además puede reaccionar con otros blancos de las células como son el ADN, ARN y lípidos (Figura 11). Las interacciones con los diversos blancos producen daño celular e incluso la muerte celular.



**Figura 11:** Esquema de la cascada de reacciones que generan daño oxidativo en el ADN. El O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son producidos por la autooxidación de las proteínas. O<sub>2</sub><sup>-</sup> puede oxidar Fe-S deshidratasa, liberando hierro en el citosol. El hierro cataliza la transferencia electrónica a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que genera el radical hidroxilo que ataca el ADN.

La vulnerabilidad de las bacterias a los oxidantes otorga a sus competidores una ventaja. Ciertas bacterias son capaces de producir especies reactivas del oxígeno y excretarlo con el fin de dañar otras células. El mecanismo por el cual los oxidantes exógenos producen el daño en la célula blanco aún no se ha dilucidado y existen pocos estudios al respecto, esto se debe a la complejidad que tiene estudiar estos mecanismos en interacciones *in vivo*. En una primera aproximación se sugiere que el peróxido de hidrógeno exógeno actúa de manera similar que el endógeno (Imlay, 2003). Con respecto al transporte del peróxido, se ha propuesto que el peróxido de hidrógeno difunde libremente a través de la membrana, aunque recientemente estudios han mostrado que

algunas membranas son poco permeables al peróxido, por lo que el transporte puede ser explicado por cambios en la composición lipídica o por proteínas canales que faciliten la difusión (Bienert y col., 2006).

Se ha encontrado que la producción de peróxido puede modular el antagonismo incluso a nivel de biopelículas como se ha descrito en el antagonismo entre *S. sanguis* y *S. mutans* en biopelícula oral (Kreth y col., 2008). La generación enzimática de peróxido de hidrógeno ha mostrado un promisorio efecto antifouling. Además, se ha observado que el peróxido de hidrógeno inhibe fuertemente el crecimiento planctónico de alfa-proteobacteria y gamma-proteobacterias marinas y a altas concentraciones se inhibe también la formación de biopelículas. (Kristensen y col., 2009)

#### **6.4.- Quorum Sensing y Comunicación Bacteriana**

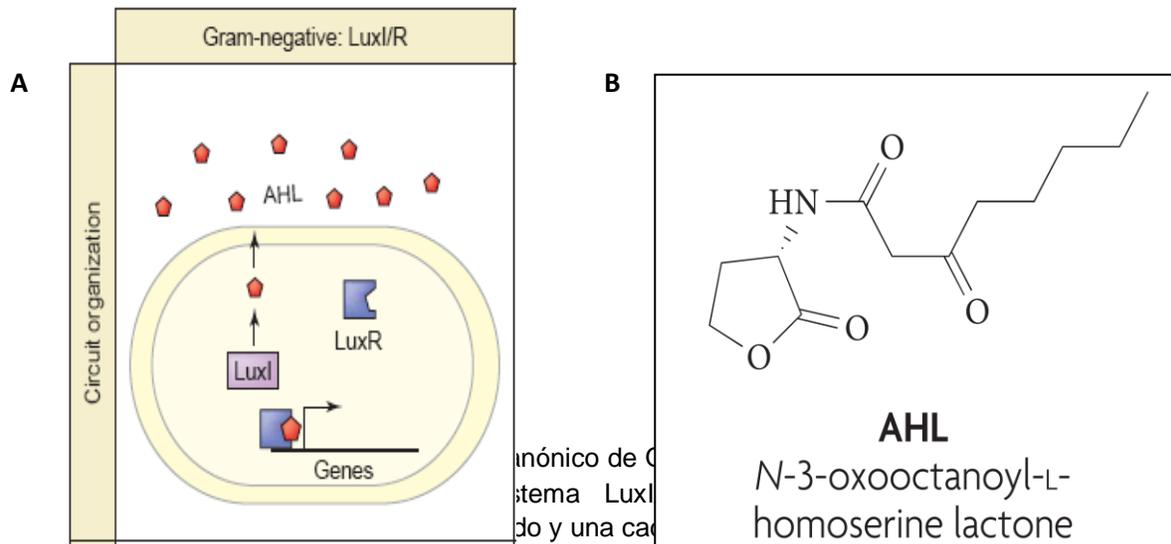
La comunicación bacteriana célula-célula conocida como Quórum Sensing (QS) regula la expresión de factores de virulencia en diferentes patógenos bacterianos y es un nuevo blanco promisorio para el control de infecciones y su ciclo de transmisión (Bruhn y col., 2005; Deifordt y col., 2011). Esta novedosa estrategia puede afectar la formación de biopelículas, disminuyendo considerablemente la posibilidad de generar resistencia (Hentzer y Givskov, 2003; Hentzer y col., 2003). Además, diversos genes de virulencia, como aquellos relacionados con adhesión, producción de toxinas y sideróforos, se hallan bajo el control de QS (Schauder y Bassler, 2001; Patriquin y col., 2008). Hay estudios en *P. aeruginosa* que sugieren que la resistencia a peróxido de hidrógeno por la expresión de genes de catalasa y superóxido dismutasa sería también regulada por este sistema (Hasset y col., 1999; Huang y Shih, 2000)

En el sistema QS las células individuales emiten pequeñas moléculas señalizadoras difusibles, denominadas autoinductores (AIs), que son producidas por una sintasa y luego sensadas por la misma célula emisora y otras células mediante la unión a un receptor intracelular que regula la expresión génica en respuesta a la acumulación de estas moléculas. De esta forma, las células sensan una combinación de factores como densidad celular, propiedades de transferencia de masa y distribución espacial celular, pudiendo coordinar el control de la expresión de genes de toda la comunidad para responder cuando sea adecuado (Hense y col., 2007). Asimismo, el ambiente generado dentro de biopelículas facilita la comunicación entre células microbianas y, por lo tanto, la

coordinación de actividades en conjunto, como el desarrollo de mecanismos de resistencia a la acción de antibióticos (Stewart y Franklin, 2008)

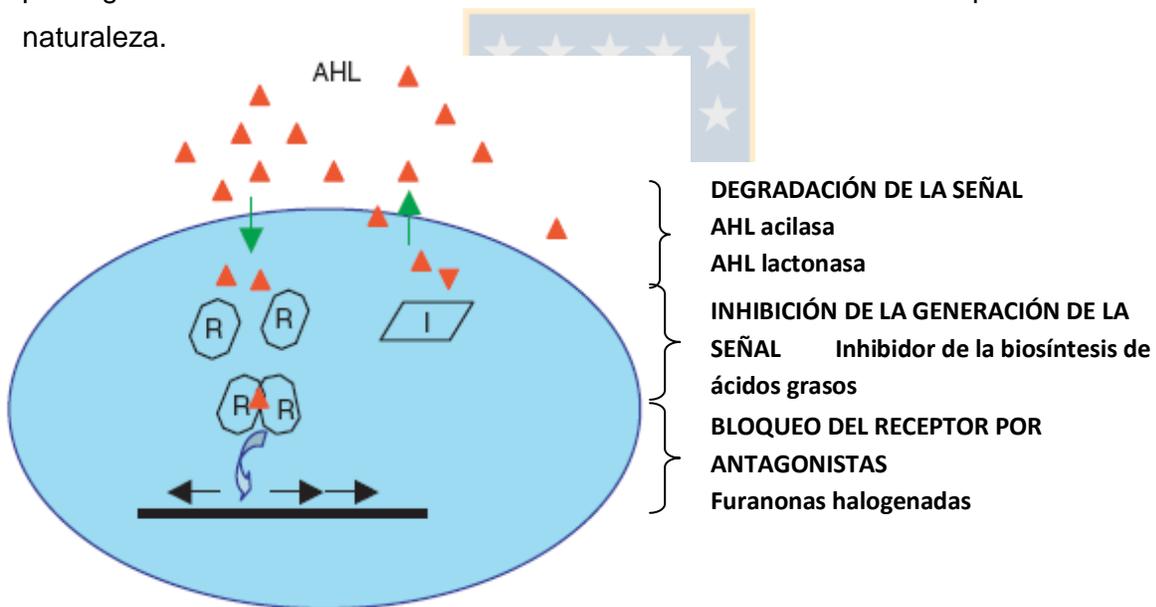
El sistema QS se encuentra conservado en una variedad de especies bacterianas, hallándose en el 7% de las bacterias Gram-negativas (McDougald y col., 2007) y en más del 50% de las bacterias cuyos genomas han sido secuenciados (Sun y col., 2004). Los sistemas QS se clasifican en tres clases basado en el tipo de AI y el mecanismo involucrado en su detección. Las bacterias Gram negativas, las cuales corresponden a la mayor parte de los patógenos de salmónidos, típicamente tienen el sistema LuxI/R (Figura 12). Las enzimas tipo LuxI sintetizan N-acil-homoserina lactonas (AHLs) por la ligación de un grupo acyl desde una acyl-acyl carrier proteína a un grupo homocisteína de S-adenosil metionina (SAM) (Figura 12). Las proteínas tipo LuxR se unen a sus respectivos AIs y controlan la expresión de genes blanco. En el caso de patógenos de peces, se ha descrito la producción de AHLs en bacterias Gram negativas como *A. hydrophyla* y *A. salmonicida*. En *F. psychrophilum* no ha sido aún detectada la producción de AHLs (Bruhn y col., 2005), aunque la secuenciación de su genoma muestra la presencia de un gen codificante para una proteína tipo LuxR que indica que si bien no sería capaz de producir AHLs por ausencia de sintasa podría ser capaz de responder a este tipo de moléculas (Duchaud y col., 2007).

Existe una amplia gama de AIs que intervienen en este sistema LuxI/R. En AHLs el grupo homoserina lactona es conservado a través de las especies, pero el largo de la cadena acil varía y puede hallarse hidroxilada u oxilada (Waters y Bassler, 2005).



Aunque no se conoce completamente la función ecológica del QS, es posible que el antagonismo bacteriano involucre un mecanismo de interferencia en este sistema de señalización, ya que se han encontrado moléculas naturales como las furanonas del alga *Delicella pulchra* que son capaces de bloquear el sistema QS en bacterias, lo que el alga utiliza como mecanismo de defensa evitando ser colonizada por bacterias. En patógenos acuáticos se ha indicado que heterólogos de AHLs son capaces de reducir la producción de factores de virulencia en *A. hydrophila* y *A. salmonicida*. En el caso de *A. salmonicida* al aplicar *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona la producción de serina proteasa fue retardada y la concentración se redujo en 50% (Swift y col., 1997) y en el caso de *A. hydrophila*, se ha observado que *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona también puede inhibir la producción de exoproteasa regulada por QS (Swift y col., 1999). Dado a que muchos patógenos de peces controlan la expresión de sus genes de virulencia a través de QS, se han propuesto posibles mecanismos de interferencia en diferentes etapas de la vía de señalización, estos incluyen inhibición de la biosíntesis de la molécula señal, bloqueo de la transducción por antagonistas (como es el caso de las furanona) y biodegradación de la molécula señal por lactonasas y acilasas (Figura 13) (Defoirdt y col., 2004). En *P. aeruginosa* PAO1, por ejemplo, en ensayos de expresión del gen *aiiA*, que codifica para una AHL lactonasa en *B. subtilis*, degradó completamente los autoinductores AHLs: *N*-oxododecanoil-L-homoserina lactona y *N*-butiril-L-homoserina lactona. La

cantidad reducida de AHL fue correlacionada con la disminuida expresión de varios factores de virulencia tales como elastasa y pirocianina. Más importante aún, estos ensayos indicaron que *aiiA* tiene un rol importante en la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* y su dispersión, como se observó en las diferencias en la formación de biopelículas en superficies sólidas y líquidas y en la estructura de la biopelícula mediante microscopía electrónica (Yao y col., 2007). Extractos de cepas de Actinomycetes pueden inhibir la formación de biopelículas de *V. harveyi*, *V. vulnificus*, and *V. anguillarum*, cepas patogénicas que producen serios problemas en la acuicultura marina de China, la mayoría de ellos dispersaron la biopelícula madura y algunas inhibieron el sistema QS de *V. harveyi* por atenuación de la actividad de AHLs (You y col., 2005). La explotación del antagonismo basado en la expresión de metabolitos o enzimas capaces de bloquear el sistema QS en patógenos de peces es una estrategia interesante para el control de patologías infecciosas en salmonicultura imitando fenómenos comunes que ocurren en la naturaleza.



**Figura 13:** Mecanismos de interferencia en el circuito de señalización bacteriano LuxI/R

## 7.- Interacciones antagónicas entre biopelículas

Las biopelículas multiespecies son ubicuas en el ambiente y representa la forma natural de crecimiento bacteriano (Hall-Stoodley y col., 2004). Con el objetivo de sobrevivir y proliferar en un consorcio complejo, las bacterias han desarrollado una variedad de interacciones con especies vecinas que van desde la competencia intensa por nutrientes y la producción de compuestos químicos, a la colaboración entre las especies para conseguir nutrientes y protección (Moons y col., 2009)

Estas interacciones entre poblaciones bacterianas pueden tener una profunda influencia en la estructura y fisiología de las comunidades microbianas. Las interacciones inter-especies comienzan a influenciar una biopelícula durante las etapas iniciales de formación, adherencia bacteriana y colonización de una superficie, y continúan influyendo en la estructura y fisiología de la biopelícula en desarrollo. Aunque la mayor parte de la investigación sobre interacciones bacterianas se ha realizado utilizando comunidades planctónicas, las características del crecimiento de biopelículas (posiciones celulares que son relativamente estables y áreas locales que impiden difusión) sugiere que las interacciones bacterianas pueden ser más importantes en biopelículas (James, 1995).

La competencia por sustrato es considerada una de las mayores fuerzas que han conducido a la evolución de las bacterias (Banks y Bryers, 1991). Numerosos datos experimentales muestran como diferentes microorganismos pueden efectivamente superar a otros como resultado de una mejor utilización de una fuente de energía dada (Banks y Bryers, 1991; Christensen y col., 2002; Komlos y col., 2005). El tipo y grado de movilidad también puede jugar un rol importante en la dominancia de la biopelícula (Moons y col., 2009)

Aparte de las características de crecimiento y movilidad, algunas bacterias deben su competitividad principalmente a la producción de sustancias que inhiben o inactivan otras poblaciones. La liberación de un compuesto tóxico por lo tanto resulta en un gradiente que expulsa a las especies sensibles de los alrededores inmediatos. Esto deja más nutrientes para el productor, cubriendo así la energía adicional que cuesta la producción de la toxina. El primer estudio que demostró que una bacteria productora de compuestos inhibitorios puede tener una ventaja competitiva durante la formación de biopelículas fue el de Rao y col., (2005), quienes indicaron que la dominancia final estará

determinada por la habilidad que tengan los microorganismos de formar rápidamente microcolonias y de los compuestos inhibitorios que produzcan.

Riley y Gordon (1999) mostraron que en co-cultivos líquidos las especies sensibles siempre serán superadas por un productor de toxinas. Sin embargo, Tait y Sutherland (2002) descubrieron que este hallazgo no siempre se extrapolaba a biopelículas. En su estudio se investigó la formación de una biopelícula mixta con diferentes sets de bacteriocinas producidas por bacterias entéricas. Ellos encontraron que las biopelículas mixtas resultantes fueron más delgadas comparadas con su contraparte mono-especies y a largo plazo coexistieron ambas especies formando microcolonias separadas. Tales microcolonias separadas fueron más tarde también observadas por Rao y col. (2005) y Moons y col. (2009). Se hipotetiza que estas estructuras protegen a la población sensible contra sustancias tóxicas, de esta forma permite una prolongada co-existencia.

Kreth y col. (2005) indicaron que el factor tiempo es también muy importante en tales competiciones. Ellos observaron que cuando *S. mutans* o *S. sanguinis* tuvieron cada uno la posibilidad de ser pre-establecido, la producción de bacteriocinas por el primero o la producción de peróxido por el segundo evitaron la colonización de la segunda especie. Sin embargo, ambas especies fueron capaces de co-existir cuando la colonización ocurrió simultáneamente.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios sobre antagonismo han sido realizados en cultivo resuspendidos a pesar que la mayoría de las bacterias viven en biopelículas. Por ejemplo, el género *Pseudomonas*, que son comunes queladores de hierro, son prolíficos formadores de biopelículas y hay una evidencia creciente que la quelación de hierro tiene una función importante en la formación de biopelícula de esta bacteria pero no hay estudios cuantitativos y concluyentes sobre el antagonismo mediado por sideroforos en biopelículas (Simões y col., 2007; Eberl y Collinson, 2009).

Las características del crecimiento en biopelículas sugieren que las interacciones bacterianas se comportan de manera diferente que en fase planctónica no pudiendo predecirse cual especie bacteriana prevalecerá en un sistema biofilm (Simões y col., 2008)

## 8.- Biocontrol en acuicultura

En 1980 Yasuda y Taga, fueron los primeros en sugerir que las bacterias no sólo podían ser útiles como alimento sino como controladores biológicos de infecciones en peces. A finales de la década del '80 surgieron las primeras publicaciones sobre control biológico en acuicultura y desde entonces ha ido en aumento la investigación sobre este tema. Con el tiempo las bacterias comenzaron a añadirse a los tanques de cultivo para prevenir la infección por patógenos o para tener un efecto nutricional (Rev. por Vershuere y col., 2000).

El término más amplio para esta tecnología de control biológico recibe el nombre de "biocontrol", término que fue acuñado en primera instancia en la agricultura y destinado al método de eliminación de patologías causadas por la introducción de organismos adversos, como parásitos o patógenos específicos. Maeda y col. (1997) introdujo el término a la acuicultura para designar a los métodos de tratamiento que usaban el antagonismo entre microorganismos para eliminar patógenos o reducir su número en el ambiente acuícola. Dentro del concepto general de biocontrol también se puede localizar el término de "probiótico" (Gatesoupe, 1999), en este caso el bicontrolador se espera que pueda tener un efecto nutricional o se asiente en el intestino del hospedador. Este término que comenzó refiriéndose a un microorganismo con un efecto positivo en el intestino del hospedador, luego se ha ido ampliando sucesivamente a un microorganismo que tiene un efecto positivo en la salud del hospedador ya sea actuando sobre el hospedador mismo, en el ambiente o en el alimento (Verschuere y col., 2000). Esta modificación del concepto se ha adaptado principalmente a causa de probióticos usados en cultivos larvales, ya que la microbiota presente en el tracto digestivo de las larvas, es frecuentemente la misma microbiota ambiental del agua y el alimento que lo rodea, no habiendo nichos separados para ellas y no pudiendo muchas veces diferenciarse donde ocurre el efecto de la bacteria benéfica (Verschuere y col., 2000)

La mayor parte de la investigación sobre el uso de antagonismo bacteriano en acuicultura se ha centrado en el desarrollo de probióticos, estos ya han sido utilizados con éxito en el cultivo de peces y camarones y pueden ser aplicados en el alimento o al tanque de cultivo con el fin de evitar infecciones con bacterias patógenas y mejorar el crecimiento y desarrollo de estos organismos (Sihag y Sharma, 2012). La mayoría de los probióticos pertenecen a bacterias ácido-lácticas (como *Lactobacillus* y *Carnobacterium*) o

a los géneros *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*) o al género *Bacillus* o *Pseudomonas* (Verschuere y col., 2000).

Actualmente no existe un tratamiento probiótico comercial indicado para el control de *F. psychrophilum*. El género *Carnobacterium* que ha sido usado como un probiótico para salmón atlántico y trucha arcoíris (Robertson y col., 2000) y que mostró actividad *in vitro* sobre *F. psychrophilum*, se determinó que no era efectivo para el control *in vivo* de este patógeno. Los géneros *Pseudomonas* (Korkea-Aho y col., 2011) y *Enterobacter* (Burbank y col., 2011), en cambio, han mostrado ser exitosos en ensayos *in vivo* pero aún no han sido aplicados a cultivos masivos para evaluar su efectividad a escala productiva. Estos recientes avances sólo han considerado antagonismo en estado planctónico y no se conoce que efecto pueda tener el antagonista sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

Aunque no es necesario que todos los probióticos formen biopelículas, la colonización de interfases es en muchas instancias un prerrequisito para la eficacia probiótica (Eberl y col., 2010). La desventaja que tiene el desarrollo de probióticos es que no son capaces de mantenerse en el ambiente y necesitan ser re-aplicados regularmente y altas concentraciones, lo que no los hace costo-efectivos. Las estrategias probióticas para la prevención y el tratamiento de enfermedades pueden requerir el descubrimiento y desarrollo de cepas que formen biopelículas efectivas. Si la formación de biopelículas facilita la colonización a largo plazo y la persistencia en una superficie, como el intestino por ejemplo, las biopelículas que mantienen sus funciones probióticas pueden ser importantes para la eficacia sostenida *in vivo*. (Defoirdt y col., 2007)

Una solución interesante a la baja de persistencia de las bacterias en el ambiente podría ser formar una biopelícula biocontroladora en el ambiente asentándose sobre superficies con el fin de evitar el asentamiento de microorganismos no deseados. En biorremediación, por ejemplo, los microorganismos pueden ser adheridos a partículas de suelo o suspendidas en el agua con el fin de convertir los contaminantes (metales, compuestos orgánicos) en moléculas menos dañinas tales como dióxido de carbono y agua, o inmovilizarlos en formas no solubles y estables, produciendo de esta manera un mejoramiento de las condiciones del agua (Diels y Lookman, 2007). En biorremediación del suelo, hace ya algunos años, las bacterias se usan como biobarreras que impiden el paso de desechos tóxicos industriales hacia fuentes de agua (Kalin, 2004) o en piscicultura se usan como biofiltros para eliminar desechos amoniacales y otros tóxicos

del agua (Hu y col., 2004). Estos ejemplos constituyen una aplicación tecnológica importante para modular el fenotipo de una biopelícula y utilizarla en un proceso específico.

En conclusión, se ha demostrado que hay antagonistas naturales de *F. psychrophilum* entre el grupo de gammaproteobacterias quimioorganotróficos aeróbicos cultivables entre los cuales se encuentra *Pseudomonas sp.*, *Carnobacterium sp.* y *Moraxella sp.* (Korkea-Aho y col., 2011; Strom-Bestor y Wiklund, 2011; Kei y col., 2006; Tiirola y col., 2002; Robertson y col., 2000), sin embargo, estos han sido estudios sólo en fase planctónica. Según lo descrito anteriormente es necesario considerar la capacidad de formación de biopelículas de los antagonistas y los mecanismos por los cuales ejercen su actividad antagónica con el fin de desarrollar biopelículas antagónicas que inhiban efectivamente la adherencia de patógenos y que sean capaces de persistir en el ambiente.



#### **IV. HIPOTESIS DE TRABAJO**

Bacterias del grupo de gamma proteobacterias quimiorganotrofas aeróbicas cultivables, que presentan mecanismos de antagonismo bacteriano, son capaces de formar una biopelícula estable y controlar la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum*

## V. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una biopelícula antagonica para controlar el asentamiento de patógenos bacterianos de peces usando como modelo microbiológico el patógeno *Flavobacterium psychrophilum*.

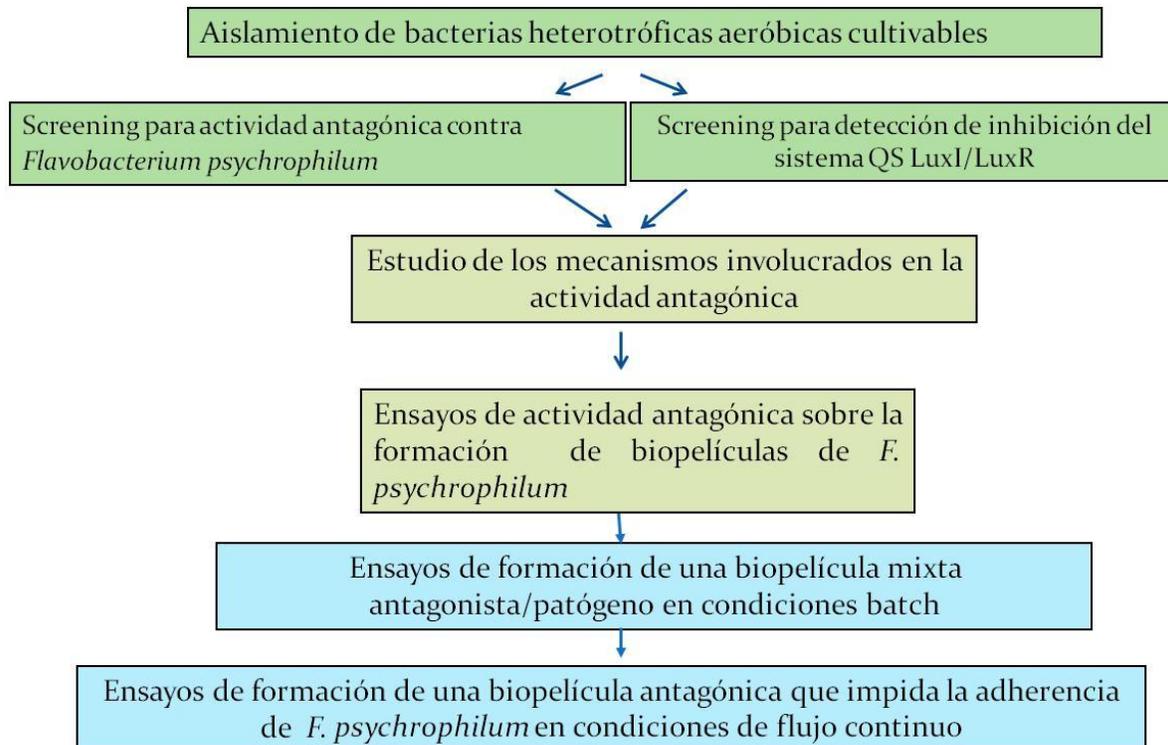
## VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Aislamiento y selección de cepas desde pisciculturas chilenas con actividad inhibitoria sobre *Flavobacterium psychrophilum*
- 2.- Caracterizar los mecanismos de antagonismo presentes en la o las cepas que demuestren mayor poder inhibitorio de la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum*
- 3.-Determinar la capacidad de la cepa antagonica de formar una biopelícula estable que controle la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum*.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### **Estrategia experimental:**

En el siguiente esquema se muestran las principales actividades realizadas para cumplir los objetivos propuestos.



**Figura 14:** Estrategia experimental utilizada para el desarrollo de la tesis, en verde se destacan las principales actividades para cumplir el objetivo 1, en gris las actividades para cumplir el objetivo 2 y en celeste las principales actividades para el objetivo 3.

## **OBJETIVO 1.- Aislamiento y selección de cepas desde pisciculturas chilenas con actividad inhibitoria sobre *Flavobacterium psychrophilum***

### **Actividad 1.1.- Aislamiento bacteriano desde piscicultura y adquisición de cepas**

#### **1.1.1.- Muestreo**

Se recolectaron muestras desde pisciculturas en fase de agua dulce en la X región, las que fueron tomadas gentilmente por la Sra. María Eugenia Raurich (Transmarko SA), las matrices utilizadas fueron tres truchas (*Oncorhynchus mykiss*) sanos adultos y tres salmones smolts (*Salmo salar*), superficies de piscicultura (estanques de acopio de peces y mangueras de descarga), y muestras de agua de los estanques. Las muestras de superficie fueron aisladas en el sitio de muestreo mediante una tórula estéril en un área de 20 cm<sup>2</sup>, la que fue colocada en medio tripticasa líquido (Merck), y analizada antes de 24 h. Las muestras de agua fueron obtenidas en frascos estériles (APHA, 1999).

Todas las muestras fueron enviadas inmediatamente en frío al Laboratorio de Biopelículas del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

#### **1.1.2.- Procesamiento de las muestras**

Las muestras de músculo, piel e intestino de peces se procedió a la disección del salmón o trucha, y en forma aséptica 1 gr. de tejido fue colocado en 9 ml de PBS (NaCl 8,01 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,27 g/l, pH=7,4) y homogenizado mediante agitador vortex y sonicación, posteriormente se hicieron diluciones seriadas desde 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup> y procedió a sembrar 100 µl en placas con agar Tripticasa (Merck) y R2A (Difco, BD, Beckton Dickinson Company), y se incubaron por 24 h a 20°C.

Se tomaron también muestras de agua que provenían de los estanques de cultivo. Se procedió a realizar diluciones seriadas de estas muestras en PBS desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> y se sembró 100 µl en placas de agar Tripticasa y R2A, las que fueron incubadas por 24 h a 20°C (APHA, 1999)

Las diversas colonias se aislaron según sus diferentes características macroscópicas incluyendo color, forma, tipo de borde y tamaño. Luego fueron enumeradas y caracterizadas microscópicamente mediante tinción de Gram (Violeta de genciana 1min, Lugol 1min, alcohol 30 seg, safranina 15 seg) (Montiel y Lam, 2001).

### 1.1.3.- Adquisición de cepas necesarias para el estudio

**a) Bacteria patógena:** Se utilizó la cepa 19749 (Código de la empresa) de *F. psychrophilum* aislada desde peces notoriamente enfermos y adquirida a la empresa Aquagestión S.A. Esta cepa fue cultivada en medio Anacker y Ordal (MAO) (Bacto Peptona 5 g/ L; extracto de levadura 0,5 g/l; acetato de sodio 0,01 g/L), TYES (*tryptone–yeast extract–salts*) (Bacto Triptona (Difco) 4,0 g/L; Extracto de levadura 0,4 g/L; CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0, 2 g/L; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l) y NB (Nutrient broth) diluido al 50% (Promega) (medio diluido en nutrientes). La identidad de la cepa fue confirmada mediante PCR utilizando los partidores PSY-1/ PSY-2 descritos por Toyama y col., 1994 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Partidores utilizados en este estudio

	<b>Secuencia 5'→3'</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Referencia</b>
<b>27F</b>	GAGTTTGATCCTGGTCAGAACGCT	63,7	Jin y col., 2011
<b>1492R</b>	TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC	69	Jin y col., 2011
<b>Psy-Fw</b>	GTTGGCATCAACACACT	54,8	Toyama y col., 1994
<b>Psy-Rev</b>	ACACTGGCAGCTTGCTA	56,9	Toyama y col., 1994
<b>Ps-Fw</b>	AAGTTGGGAGGAAGG	47,3	Este trabajo
<b>Ps-Rv</b>	ACACAGGAAATTCCACCACCC	57,6	Este trabajo

**b) Bacteria antagonista:** La cepa MT5 de *Pseudomonas* sp. fue donada gentilmente por la Dra. Marja Tirola (Department of Biological and Environmental Science, University of Jyväskylä), la cual posee actividad antagónica conocida sobre *F. psychrophilum* (Tirola y col., 2002). Esta cepa fue usada como control en los ensayos de antagonismo y cultivada en NB diluido 50%.

**c) Bacterias aisladas de pisciculturas:** 48 cepas aisladas de piscicultura fueron donadas gentilmente por el Dr. Gerardo González (Laboratorio Antibióticos de la Universidad de Concepción). Estas cepas fueron aisladas desde sedimentos, mucus y contenido intestinal desde alevines y adultos por Miranda y Rojas (2007). . Fueron cultivadas en NB diluido al 50%

**d) Bacterias biosensoras para Quorum sensing:** Se utilizaron las cepas reporteras (Tabla 3). Las cepas de *Chromobacterium violaceum* fueron donadas gentilmente por el Dr. Alejandro Dinamarca, Departamento de Biotecnología Microbiana, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. *C. violaceum* ATCC 12472 es una cepa pigmentada “*wild type*” usada para detectar potencial inhibidores de señales de quórum (porque produce pérdida de pigmentación). *C. violaceum* ATCC 31532 es una cepa *wild type* no pigmentada, sobreproduce N-hexanoil-L-homoserina lactonas (C6-HSL) y corresponde a un control positivo para detección de HSL (McLean y col., 2004). *C. violaceum* CV026 es una cepa para detectar señales de quórum sensing (QS), es una mutante de ATCC 31532 y puede detectar autoinductores: N-butil-L-homoserina lactona (C4-HSL) o C6-HSL.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fueron donadas gentilmente por el doctor Stephan K. Farrand, Departamento de Microbiología, Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) es una cepa que detecta principalmente N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona (oxo-C8-HSL) y N-(3-hidroxi-octanoil)-L-homoserina lactona (hidroxi-C8-HSL). pZLR4 es un plásmido conteniendo insertos desde pTiC58, el cual codifica la fusión *traG::lacZ* y también *traR* (Farrand y col., 2002). Esta cepa no produce su propio acyl-HSL; consecuentemente, la fusión *lacZ* no es expresada a menos que una acyl-HSL exógena sea añadida (Cha y col., 1998) (Table 2). El vector confiere resistencia a gentamicina, por lo tanto, esta cepa se mantuvo en medio LB (Merck) más gentamicina (30 µg/ml). *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pTiC58 $\Delta$ *accR*) es una cepa sobreproductora y un control positivo para la detección de HSL. Esta cepa de

*Agrobacterium* contiene un plásmido *tra<sup>c</sup>* y constitutivamente sintetiza HSL. El plásmido Ti fue descrito por Beck von Bodman y col., (1992). Todas estas cepas se mantuvieron en LB a 28°C.

**Tabla 3.** Cepas utilizadas en ensayos de quórum sensing tipo LuxI/R

<b>Cepa</b>	<b>Característica</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>C. violaceum</i> ATCC 12472</b>	Cepa tipo productora de C6-HSL	indicador QSI	McLean y col., 2004
<b><i>C. violaceum</i> CV026</b>	mini Tn5 mutante de 31532	biosensor de cadena corta C4- a C8-HSL	McClellan y col., 1997
<b><i>C. violaceum</i> ATCC 31532</b>	No pigmentada, producción de C6 HSL	Control positivo para ensayo AHL	McLean y col., 2004
<b><i>A. tumefaciens</i> NTL4</b>	pZLR4, <i>traG::lacZ</i> y <i>traR</i> <i>AmR</i> , <i>CarbR</i>	biosensor de cadena larga 3-oxo y 3-hidroxi- C8-HSL	Farrand y col., 2002
<b><i>A. tumefaciens</i> NT1</b>	(pTiC58 $\Delta$ <i>accR</i> ) Sobreproductora	Control positivo para ensayo AHL	Farrand y col., 2002
<b><i>A. tumefaciens</i> NT4</b>	No produce AHL	Control negativo para ensayo de AHL	Farrand y col., 2002

#### 1.1.4.- Conservación y recuperación de cepas bacterianas

Todas las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis fueron mantenidas en criotubos en medios de cultivo líquidos con glicerol al 20% v/v a una temperatura de -80°C en un congelador (Sanyo, Modelo MDF-U60865).

Cuando fue necesaria la recuperación de las cepas, en condiciones de asepsia, se raspó el contenido con un asa estéril, evitando el descongelamiento. Se sembró en el agar correspondiente de modo de obtener colonias aisladas.

## Actividad 1.2.- Caracterización de la cepa patógena

### 1.2.1.- Caracterización fenotípica

Se utilizó el kit RapID NF plus (Remel®) para la caracterización de bacterias Gram negativas según instrucciones del fabricante, además se realizó la prueba de catalasa y de la oxidasa. La detección de catalasa se realizó colocando una colonia en un portaobjeto y luego agregando dos gotas de peróxido de hidrógeno al 30% (Montiel y Lam, 2001). La detección de oxidasa fue realizada utilizando tiras reactivas Bactident® oxidasa, Merk, según instrucciones del fabricante.

### 1.2.2.- Secuenciación ADNr 16s de *Flavobacterium psychrophilum*

El ADN fue extraído mediante el kit Genomic DNA purification kit (Wizard, Promega, Madison, Wisconsin). Se realizó la amplificación del ADNr16s con los primarios 27F y 1492R (Jin y col., 2011) (Table 2). La amplificación fue realizada con *GoTaq DNA Polymerase* (Applied Biosystems, Foster City, California) y se usaron 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto. Los productos PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1.5% y fueron purificados y secuenciados en MacroGen Corp, US. Las secuencias fueron analizadas usando el programa NCBI Blastn.

### 1.2.3.- Curva de crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum*

**a) Recuento bacteriano mediante densidad óptica:** Se realizó la curva de crecimiento en los medios de cultivo TYES y NB diluido al 50%. Para esto se trabajó a partir de un inóculo aproximado de  $1 \times 10^4$  ufc/ml en un matraz con 100 ml de medio. Luego, durante 96 h se obtuvieron alícuotas desde el matraz para medir su densidad óptica en el espectrofotómetro TU-1810 Split Beam a una longitud de onda de 540 nm.

**b) Recuento de células cultivables:** Además se realizó recuento bacteriano cultivable en agar NB con nutrientes diluidos al 50% mediante la técnica de la microgota (Da Silva, 1996), para ello se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  de cada

alícuota tomada en la actividad anterior. Se sembró 20  $\mu$ l de cada dilución en un cuadrante de una placa de agar por triplicado. Las placas fueron incubadas a 15°C durante 7 días. Luego se contaron las colonias en las placas y se determinó las unidades formadoras de colonias (UFC) correspondientes por ml de cultivo.

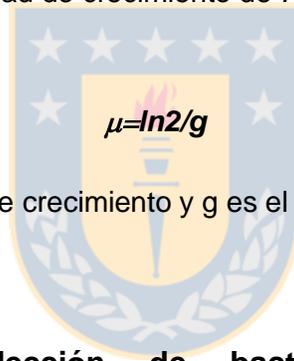
A partir de la fase exponencial de la curva de recuento se determinaron los parámetros cinéticos  $\mu$  y el tiempo generacional.

Se obtuvo un tiempo de generacional mediante la siguiente fórmula:

$$g = t - t_0 / 3,3 (\log N - \log N_0)$$

donde g es el tiempo generacional, N es el recuento al tiempo t y  $N_0$  es el recuento inicial a  $t_0$ .

Para determinar la velocidad de crecimiento de *F. psychrophilum* se utilizó la siguiente fórmula



$$\mu = \ln 2 / g$$

Donde  $\mu$  es la velocidad de crecimiento y g es el tiempo generacional

### **Actividad 1.3.- Selección de bacterias antagónicas contra *Flavobacterium psychrophilum***

#### **1.3.1.- Ensayo de antagonismo bacteriano**

La actividad antagónica de las cepas bacterianas de piscicultura se determinó mediante un método de difusión en agar modificado de May y col., (1997). Se realizaron tapices en agar nutritivo de las cepas bacterianas desde un inóculo McFarland 0,5 en agua estéril y fueron cultivados durante 24 h a 28°C. Desde estos cultivos, se tomaron asépticamente 3 discos de agar (7 mm de diámetro por 5 mm de alto) que fueron colocados sobre placas petri conteniendo 20 ml de agar nutritivo modificado (conteniendo 0,5 g/l de carbón activado) previamente tapizado con *F. psychrophilum* y sin crecer con un McFarland 0,5. Las placas fueron incubadas a 15°C por 5 días. El efecto inhibitorio de antagonismo fue evidenciado por halos de inhibición alrededor de la cepa antagonista, los

que fueron medidos en mm. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Halos mayores a 7 mm de diámetro fueron considerados como inhibición positiva.

### 1.3.2.- Detección de efecto anti-quorum sensing tipo LuxI/R

Se realizó un “*screening*” para inhibidores de Quórum Sensing (QSI) entre las cepas bacterianas aisladas de piscicultura.

Para la detección de moléculas de cadena corta, las cepas a ensayar fueron sembradas en una placa de agar LB diluido al 50% y crecidas durante 24 h a 30°C. Alcanzado el crecimiento, los microorganismos fueron cubiertos con 5 ml de agar LB semisólido (caldo LB conteniendo 0,5% p/v de agar) (fluka, Buchs, Switzerland) enfriado a 45°C, el cual contenía 10<sup>6</sup> ufc/ml de la cepa indicadora *C. violaceum* ATCC12472. Como control positivo se utilizó *P. aeruginosa* PAO-1 ya que sus dos moléculas señales, 3-oxo-dodecanoyl homoserina (3-oxo-C12-HSL) y N-butanoil homoserina lactona (C4-HSL) se unen competitivamente e inhiben el receptor para N-hexanoil homoserina lactona (C6-HSL) en ambos microorganismos indicadores. La misma cepa *C. violaceum* ATCC 12472 fue utilizado como control negativo el cual produce C6-HSL por lo tanto no inhibiría su propio QS (McLean y col., 2004).

Para la detección de bloqueo de cadena larga se preparó una suspensión de la bacteria indicadora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (Tabla 2), la suspensión contenía 10 ml de medio AB con 0.7% de agar, 1 ml de la cepa indicadora en fase exponencial tardía y X-gal (5-bromo-4-cloro-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido) 40  $\mu$ g/ml a 45°C (Farrand y col., 2002). Luego cuando se solidificó el agar se colocó la cepa sobreproductora *A. tumefaciens* NT1 (Tabla 1) en el centro de placa y perpendicularmente a ella se dispusieron las cepas a ensayar. El ensayo se realizó de esta manera debido que la cepa indicadora no produce su propio AHL por lo tanto en este caso el autoinductor exógeno provenía de la cepa sobreproductora (Farrand y col., 2002). Un disco de papel impregnado con 400  $\mu$ g de Vainillina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fue usado como control positivo.

## **Actividad 1.4.- Caracterización de las cepas antagonistas y evaluación de la actividad inhibitoria de sus sobrenadantes**

### **1.4.1.- Identificación fenotípica**

Para la caracterización fenotípica de las cepas Gram negativas que presentaron algún tipo de antagonismo, se utilizó un kit RapID NF plus (Remel®) de identificación rápida y ensayos de catalasa y oxidasa como se describió en la sección 1.2.1.

### **1.4.2.- Extracción de sobrenadantes libres de células**

Las bacterias que presentaron efecto antagónico positivo fueron cultivadas en medio NB diluido al 50% en agitación (200 rpm) hasta fase estacionaria alcanzando una densidad óptica superior a 0,7 a 600 nm equivalente a un McFarland 3. El número exacto de células se estableció mediante recuento en placa y se estableció en un rango de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  ufc/ml. Luego los cultivos fueron centrifugados en la centrifuga Eppendorf 5415D a 10000 rpm por 10 min. Finalmente, se extrajo los sobrenadantes, los cuales fueron filtrados con un filtro ester celulosa para jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$  (Dismic®-25AS). Estos sobrenadantes fueron guardados a  $-20^\circ\text{C}$  para evitar cualquier contaminación hasta su utilización. Se realizó además la liofilización de estos sobrenadantes en el liofilizador Christ®Alpha 1-2 para aumentar su concentración 40 veces y ensayar su actividad en el ensayo de difusión en agar.

### **1.4.3.- Cuantificación relativa de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes**

Para comparar el efecto inhibitorio de los sobrenadantes provenientes desde las cepas antagónicas, se realizó un ensayo en microplaca de 24 pocillos (Nunclon, Nunc, Myriad Industries, San Diego, CA, USA), en el cual se enfrentó *F. psychrophilum* a diluciones seriadas a la mitad de cada uno de los sobrenadantes desde 1/2 a 1/32 para determinar su máxima dilución inhibitoria (MID), definido como la máxima dilución de sobrenadante que permite la inhibición de crecimiento bacteriano. Las diluciones seriadas

se prepararon en los pocillos con 1 ml de medio NB. Al primero de ellos se añadió 1 ml de sobrenadante hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución original, se consideró que la concentración de sobrenadante en ese pocillo equivalía a 50% de la concentración original). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones fueron estudiadas, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con sobrenadante, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. La serie de tubos se completó con un control sin sobrenadante que solamente contuvo 1 ml de medio. El inóculo de *F. psychrophilum* se preparó a partir de una un McFarland 0,5 (aprox  $1 \times 10^8$  ufc/ml) para obtener una concentración final de  $5 \times 10^5$  ufc/pocillo. La placa fue leída a las 48 h de cultivo en el lector de microplacas Synergy 2, Biotek, facilitado gentilmente por el Departamento de Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción



### **Actividad 1.5.- Determinación del efecto inhibitorio de sobrenadantes antagonicos sobre la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum***

#### **1.5.1.- Formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum***

Se realizó un ensayo de microplaca de 24 pocillos en el cual se inoculó una dilución 1:100 de un cultivo densidad óptica 0,3. Diariamente se fueron realizando mediciones espectrofotométricas de la fase planctónica y de la biopelícula. La formación de biopelícula se determinó mediante la técnica de tinción con cristal violeta (Certistain®, Merk). Para ello, en el pocillo libre de fase planctónica se agregó 200  $\mu$ l de cristal violeta y se incubó durante 45 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua destilada para retirar el exceso de cristal violeta y los restos de fase planctónica. Posteriormente se agregó etanol al 90% y se incubó durante 10 min. Finalmente se realizó la lectura espectroscópica a 595 nm. Se utilizó como control abiótico un pocillo conteniendo sólo medio de cultivo el cual fue sometido al mismo proceso que los demás.

### **1.5.2.- Determinación de la capacidad antagónica de los sobrenadantes sobre la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum***

Se aplicó en los pocillos de la microplaca, una concentración sub-inhibitoria de sobrenadante de las cepas seleccionadas con mayor efecto antagónico. Luego de esto, *F. psychrophilum* se cultivó en medio NB diluido al 50% y se incubó en una microplaca de 96 pocillos el tiempo necesario para permitir la formación de biopelículas (Álvarez y col., 2006). La densidad óptica del cultivo de *F. psychrophilum* fue medido a 540 nm. Luego se removió el cultivo planctónico del pocillo y los pocillos fueron lavados con agua destilada estéril tres veces. Posteriormente los pocillos se tiñeron con cristal violeta diluido al 1% por 45 min. El colorante se eliminó mediante lavados sucesivos con agua destilada estéril. Las placas finalmente se secaron al aire y el cristal violeta se solubilizó con etanol para su lectura a 595 nm. La cuantificación de la formación de biopelículas se realizó usando la fórmula  $SBF = (AB - CW) / G$ , en la cual SBF es el índice específico de formación de biopelículas, AB es la densidad óptica a 595 nm de las células adheridas y teñidas, CW es la densidad óptica a 595 nm de los pocillos control conteniendo medio de cultivo libre de bacterias (control abiótico) y G es la densidad óptica a 535 nm de las células cultivadas en caldo de cultivo. (Niu y Gilber, 2004). Se realizaron 4 réplicas.

**OBJETIVO 2.- Caracterizar los mecanismos de antagonismo presentes en la o las cepas que demuestren mayor poder inhibitorio de la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum***

**Actividad 2.1.- Determinación preliminar de la naturaleza química de los compuestos antagónicos en los sobrenadantes**

### **2.1.1.- Detección de moléculas señal capaz de bloquear Quorum Sensing**

Para determinar si el bloqueo en el Quorum Sensing era debido a la producción de moléculas análogas, se realizó la detección de autoinductores mediante biosensores. La cepa biosensora *C. violaceum* CV026 se utilizó para la detección de moléculas C4- a C8-HSL (McClellan y col., 1997) lo que fue evidenciado por la inducción del pigmento púrpura violaceína propio de esta bacteria en respuesta al autoinductor. Si la cepa antagonista produce C8-HSL, éste se libera al ambiente y difunde dentro del biosensor. C8-HSL entonces se une al regulador transcripcional CviR y participa en la expresión de violaceína. Se utilizó como control positivo la cepa *C. violaceum* 31532 (McClellan y col., 2004). Además se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Como control positivo se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* NTL4 (pTiC58 $\Delta$ accR) que sobreexpresa constitutivamente el autoinductor y como control negativo la cepa NTL4 que carece del plásmido Ti y no produce AHL detectable con el sistema. El ensayo se realizó preparando una suspensión de la cepa reportera en medio AB con agar 0.7% y conteniendo X-gal 40  $\mu$ g/ml. La suspensión se colocó sobre una placa que tiene un agar base de medio AB (agar 1,5%) (Farrand y col., 2002)

### **2.1.2.- Determinación de la naturaleza bioquímica del sobrenadante**

Para estudiar la existencia de compuestos que fueran de naturaleza proteica, lipídica o glucídica Se realizó un tratamiento previo del sobrenadante en su concentración mínima inhibitoria con proteinasa K (US Biological) (1 mg/ml), lipasa tipo I de germen de trigo (Sigma) (1 mg/ml) y  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformes* (Sigma) (1 mg/ml). La

enzima y el sobrenadante fueron mezclados en una relación 1:9 e incubados a temperatura ambiente por 2 h, la reacción se detuvo incubando 5 min a 100°C (Ström-Bestor y Wiklund, 2011) y luego se ensayó la actividad del sobrenadante tratado sobre el crecimiento de *F. psychrophilum* en microplaca como se describe anteriormente (sección 1.4.3). Los sobrenadantes que perdieron su actividad inhibitoria con el tratamiento fueron considerados de naturaleza proteica. La estabilidad a la temperatura se determinó realizando un tratamiento del sobrenadante a 100°C por 30 min.

### **2.1.3.- Detección de peróxidos**

Para determinar la producción de peróxidos se realizó un tratamiento previo del sobrenadante con catalasa (Sigma) 1mg/ml (Ström-Bestor y Wiklund, 2011), a las cepas que perdieron su capacidad antagónica en el tratamiento con catalasa, se les realizó además un ensayo en placa para evidenciar la producción de peróxido de hidrógeno. Para ello se utilizó el medio TMB (Tetrametil Benzidina) (Sigma) en el cual las colonias productoras de peróxido se observan de color azul dado que la peroxidasa (Sigma) presente en este medio oxida el TMB del medio en presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por las cepas (Eschenbach y col., 1989).

### **2.1.4.- Detección de sideróforos**

La producción de sideróforos, también es un mecanismo frecuente de antagonismo, para determinar su presencia, se utilizó el medio Chrome Azurol Sulfate (CAS) según Schwyn y Neilands, (1987). En este medio, el sideróforo secuestra el hierro del complejo CAS-Hierro y se produce un cambio de color por desplazamiento del cromóforo. De azul a amarillo indica la presencia de carboxilatos, de azul a naranja hidroxamatos y de azul a púrpura catecoles (Schwyn y Neilands 1987).

Antes de realizar el ensayo, cada cepa se hizo crecer en un medio químicamente libre de hierro correspondiente al medio mínimo (MM9) 1X por 24 h a 28°C con agitación (120 rpm). El medio estaba compuesto de 0,3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, esta solución fue autoclavada y suplementada con 10 ml de glucosa al 20%. Después de la incubación, los cultivos fueron ensayados en placas de agar CAS (Schwyn y Neilands,

1987) y en paralelo fueron centrifugados a 10.000 rpm por 15 min seguido de filtración a través de un filtro para jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$  (Miliipore) para obtener el sobrenadante libre de células sin diluir, el cual fue examinado para la presencia de sideróforos mediante ensayo de con solución CAS (Schwyn y Neilands, 1987).

**2.1.5.- Determinación preliminar de la naturaleza química del sideróforo:** Se realizaron los siguientes test espectrofotométricos según Jalal y Helm, (1990)

**a) Hidroxamatos:**

**Test de  $\text{FeCl}_3$ :** Se mezcló un ml de sobrenadante y 1 a 5 ml de  $\text{FeCl}_3$  2%. Luego se realizó un espectrograma entre 400 y 500nm. El sideróforo hidroxamato debe tener una señal de absorbancia entre 420 y 450 nm.

**Test Tetrazolium:** A una pequeña cantidad de sal de tetrazolium se le añadió 1 a 2 gotas de  $\text{NaOH}$  2N y 1 ml de la muestra problema (sobrenadante antagónico). En esta tesis se usó como sal de tetrazolium el cloruro de cianoditolil tetrazolium (CTC) ( $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_5$ ) (Sigma-Aldrich). Si el sideróforo es del tipo hidroxamato la mezcla se vuelve de color rojo.

**b) Catecolatos:**

**Test de Arnow:** A 1 ml de sobrenadante se le agrega 0,1 ml de  $\text{HCl}$  5N y 0,5 ml de una solución de nitrito-molibdato (10 g de  $\text{NaNO}_2$  y de  $\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 50 ml de agua). Finalmente se le agrega 0,1 ml de  $\text{NaOH}$  10N. El sideróforo de tipo catecolato vuelve la mezcla de color rojo. La absorbancia se mide a 515 nm.

**Test de  $\text{FeCl}_3$ :** se realiza como se describió más arriba pero el sideróforo catecolato muestra una señal de absorbancia a 495 nm.

### **c) Carboxilatos:**

**Test espectrofotométrico:** a un ml de sobrenadante se le añade 1 ml de  $\text{CuSO}_4$  250  $\mu\text{M}$  y 2 ml de buffer acetato pH 4. La absorbancia máxima de los carboxilatos se observa entre 190 y 280 nm.

#### **2.1.6.- Efecto de los sideróforos en la inhibición de *Flavobacterium psychrophilum***

Se utilizaron concentraciones saturantes de  $\text{FeCl}_3$  (Ström-Bestor y Wiklund, 2011) de 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  y 800  $\mu\text{M}$  considerando que el sideróforo no debiera tener un efecto sobre *F. psychrophilum* si la bacteria dispone de suficiente hierro. El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pocillos (Nunc), en cada pocillo se depositó la dilución máxima inhibitoria (DMI) de sobrenadante antagónico en medio NB diluido al 50%, que corresponde a la máxima dilución que permite la inhibición del crecimiento. Se agregó, además, la concentración a ensayar de  $\text{FeCl}_3$  y se colocó un inóculo de *F. psychrophilum* de  $1 \times 10^5$  ufc/ml. Se incubó la microplaca por 3 días y se cuantificó el crecimiento bacteriano al final de este tiempo determinando la densidad óptica de *F. psychrophilum* a 540 nm. Se realizaron 3 réplicas de este ensayo y se obtuvo el promedio de ellas y su desviación estándar.

#### **Actividad 2.2.- Caracterización de actividad inhibitoria del sobrenadante sobre recuentos cultivables y viables de *Flavobacterium psychrophilum***

##### **2.2.1.- Efecto del sobrenadante sobre el recuento de bacterias cultivables de *Flavobacterium psychrophilum* en fase planctónica**

Para evaluar la actividad inhibitoria bactericida y bacteriostática a diferentes concentraciones de sobrenadante, se realizó un ensayo en microplaca en el cual se ensayaron diluciones seriadas del sobrenadante de 50% a 6,25%. El inóculo de *F. psychrophilum* fue  $1,5 \times 10^5$  ufc/ml. Posteriormente la microplaca fue incubada a 15°C por 48h. Pasado el tiempo, se realizó el recuento en placa del crecimiento obtenido en los

pocillos según como se describió anteriormente (Sección 1.2.3b)

### **2.2.2.- Efecto del sobrenadante sobre la viabilidad de la biopelícula en formación de *Flavobacterium psychrophilum***

Se comenzó la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* en presencia del sobrenadante antagonico como en la sección 1.5.2. Luego de cuatro días de incubación se resuspendió la biopelícula adherida y se tiñeron las células vivas mediante el *kit Live/Dead BacLight* (Invitrogen). Esta técnica se basa en la utilización de la permeabilidad de la membrana de la célula bacteriana como criterio de diferenciación entre células vivas y muertas. Las células muertas se tiñen con yoduro de propidio ( $C_{27}H_{34}I_2N_4$ ), compuesto que no es capaz de atravesar membranas biológicas, por lo que penetra sólo a células con permeabilidad alterada o muertas (Pascaud y col., 2009; Boulos y col., 1999). Las células vivas son teñidas con syto-9 compuesto que se difunde libremente a través de membranas biológicas, tiñendo sólo a las vivas (Pascaud y col., 2009). El procedimiento fue el siguiente: Se mezcló una alícuota de 300  $\mu$ L de la muestra con 300  $\mu$ L de Tinción *Baclight*. Desde la muestra se realizaron diluciones seriadas en caso de ser necesario. Luego de 10 min de incubación en oscuridad, la muestra se filtró al vacío, a través de un filtro de policarbonato negro de 25 mm de diámetro y 0,2  $\mu$ m de poro (PCTE Membrane, MFS). El filtro seco se dispuso sobre un portaobjetos que contenía una gota de aceite de montaje, sobre el filtro se dispuso otra gota de aceite de inmersión para fluorescencia (Cargille Laboratories INC), sobre la cual se fijó un cubreobjeto. La preparación se visualizó con aceite de inmersión utilizando un aumento de 100X en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) con el filtro adecuado. Por cada filtro se fotografiaron al menos 4 campos con un mínimo de 30 células por campo utilizando el software Image-Pro Plus v.5.0 (MediaCybernetics) (Jr y Pratt, 1994). Obtenido el promedio de bacterias por fotografía se procedió a calcular el número de bacterias presentes en la alícuota (300  $\mu$ L), la que equivale al número de bacterias totales presentes en el filtro mediante la siguiente fórmula:

$$X = \frac{\text{area filtro } mm^2}{\text{áera fotografía } mm^2} \cdot \bar{X},$$

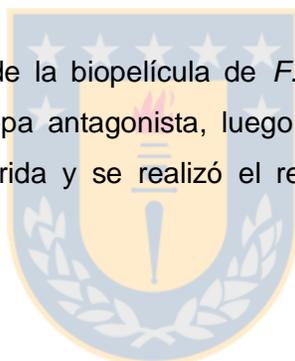
Donde  $\bar{X}$  es el promedio de células por foto y  $X$  es el número de bacterias por filtro que se desea calcular. Considerando que las otras dos variables son contantes, la expresión que se utilizó fue la siguiente:

$$X = 40212,72 \bullet \bar{X}$$

Con el número de células por filtro es posible determinar el número total de células en 1 ml considerando el factor de dilución empleado y el volumen de la alícuota.

### **2.2.3.- Efecto del sobrenadante sobre el recuento cultivable de la biopelícula en formación**

Se realizó la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* en presencia del sobrenadante obtenido de la cepa antagonista, luego de cuatro días de formación se resuspendió la biopelícula adherida y se realizó el recuento como se describió en la sección 1.2.3.



**OBJETIVO 3.-Determinar la capacidad de la cepa antagónica de formar una biopelícula estable que controle la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum***

### **Actividad 3.1.- Selección del antagonista adecuado y secuenciación del ADNr16s esta bacteria**

La selección de la cepa antagonista se realizó considerando los resultados del objetivo 2. Se realizó la amplificación del ADNr16 de la cepa seleccionada con actividad inhibitoria sobre fase planctónica y la biopelícula en formación de *F. psychrophilum*. Se realizó la purificación y secuenciación de un fragmento de 1515 pb en Macrogen corp USA, usando los partidores 27F y 1492R (Jin y col., 2011). El procedimiento fue el mismo utilizado para la secuenciación del ADNr 16s de *F. psychrophilum*.

### **Actividad 3.2.- Evaluación del efecto del sobrenadante sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* en el tiempo**

Se realizó un ensayo como en la sección 1.5.2, pero en este caso se evaluó el efecto del sobrenadante durante 3 días. Diariamente se determinó la fase adherida a 595 nm. Se utilizó un control sin sobrenadante.

### **Actividad 3.3.- Formación y visualización de la biopelícula antagonista**

#### **3.3.1.- Ensayo de formación de la biopelícula antagonista en microplacas**

Para la formación de la biopelícula en microplacas de poliestireno se colocó en cada pocillo 2 ml de de caldo NB diluido al 15% y luego se agregó un inóculo de  $1 \times 10^5$  ufc/ml de la bacteria antagonista en el pocillo. Se realizaron 3 réplicas y se realizó la cuantificación de la biopelícula adherida mediante tinción con cristal violeta como se indicó anteriormente (Sección 1.5.2).

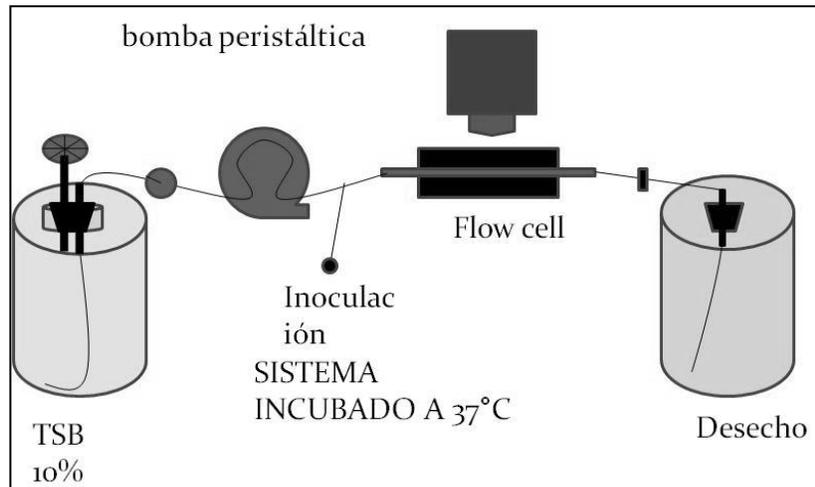
#### **3.3.2.- Visualización de la biopelícula antagonista en condiciones batch**

La biopelícula se formó en argollas de poliestireno con área superficial de  $5 \text{ cm}^2$  cada una, estas argollas fueron obtenidas de secciones transversales de un tubo de poliestireno (16 ml, 16x125mm, BD Falcon™, USA). La esterilización de las argollas se realizó mediante un lavado con hipoclorito de sodio, seguido de un lavado con agua destilada estéril, sonicación por 5 min (Branson B1510, Ultrasonic Cleaner) y finalmente se colocaron en agua destilada llevando el líquido a ebullición. Las argollas se colocaron en forma aséptica en un matraz de 50 ml utilizando un inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  ufc/ml. El matraz se mantuvo en agitación a 120 rpm durante 3 días. Luego se obtuvo un trozo de la argolla y se fijó con glutaraldehído 4% para su visualización mediante microscopía

electrónica de barrido. El microscopio utilizado (JEOL JSM-6380 LV) fue facilitado por la unidad de microscopía electrónica de la Universidad de Concepción.

### 3.3.3.- Visualización de biopelícula antagonista en condiciones de flujo

Las biopelícula fue cultivada en capilares de borosilicato (Friedrich y Dimmock), estos capilares tienen una sección de corte rectangular y cortados al grosor de un cubreobjeto (0.90mm I.D. x 0.15mm pared) para permitir la directa observación en el microscopio de la biopelícula formada dentro del capilar. Como alimentación del reactor se usó caldo NB diluido al 15% durante el crecimiento de la biopelícula. El sistema tuvo una línea de ingreso para el inóculo (Figura 15), que consistió de una manguera con un tapón de goma en el extremo, de manera que la inoculación se realizó mediante inyección a través del tapón. El ensamblaje se autoclavó por 20 min antes de la inoculación. El flujo utilizado fue 1 ml/min (24 ml/h corresponde a un número de Reynolds de 10, resultando en flujo laminar). El experimento se realizó en una pieza con temperatura regulada a 20°C. Para el inóculo, se tomó una colonia de cada especie que fue colocada en NB diluido al 50% y agitada durante 24 hrs a 20°C. 10 ml de este cultivo es inoculado en el reactor (OD600 para  $2,7 \times 10^8$  células/ml. Este sistema se mantuvo en funcionamiento durante 3 días y luego se realizó la tinción de vivas y muertas como se describió anteriormente inyectando en el sistema 1 ml de reactivo *Baclight* para tinción de vivas y muertas, se incubó durante 10 min, luego se hace circular medio nuevamente para eliminar el exceso y se observa el capilar por microscopía de epifluorescencia Olympus BX51



**Figura 15.** Diagrama que muestra el sistema instalado para la visualización de la biopelícula antagonista

### **Actividad 3.4.- Efecto de la biopelícula antagonista sobre la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* en condiciones batch**

#### **3.4.1.- Ensayo de formación de biopelículas mixtas en sobre argollas de poliestireno**

Se evaluó el efecto de la biopelícula antagonista sobre *F. psychrophilum* bajo dos condiciones: al ser ambas bacterias co-inoculadas al mismo tiempo y al ser formada la biopelícula antagonista previo a la inoculación de *F. psychrophilum*. Se utilizaron como control la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* y del antagonista por separado.

Para realizar el ensayo se utilizaron tres matraces y en su interior se depositaron 30 argollas de poliestireno de una superficie de 5 cm<sup>2</sup> cada una obtenidas como en la sección 3.3.2. En el primer matraz se inoculó solamente el patógeno a concentración final 1x10<sup>5</sup> ufc/ml, en el segundo matraz se inoculó el antagonista y el patógeno al mismo tiempo, cada especie a concentración final 1x10<sup>5</sup> ufc/ml y en el tercer matraz se formó

previamente la biopelícula del antagonista antes de inocular el patógeno. En el último caso el antagonista se inoculó a concentración final  $1 \times 10^5$  ufc/ml y se dejó formar la biopelícula antagónica por 48 h antes de la inoculación de *F. psychrophilum* a  $1 \times 10^5$  ufc/ml de concentración final. Los matraces se mantuvieron en agitación durante 3 días y se analizó la formación de biopelícula en una argolla cada día por tinción de vivas y muertas. Las argollas fueron lavadas con agua destilada estéril y luego las células adheridas a la superficie fueron resuspendida por sonicación por 1 min. Finalmente las células fueron teñidas con tinción *Baclight* y filtradas como se indicó anteriormente. Los filtros fueron visualizados mediante el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51) utilizando un aumento de 100X con el filtro adecuado descrito anteriormente. Las células del patógeno y del antagonista fueron diferenciadas mediante el tamaño de las células.

Cada ensayo fue repetido 3 veces y se obtuvo el promedio de los datos y su desviación estándar.



### 3.4.2.- Cuantificación de las células adheridas mediante PCR tiempo Real

A las 72 h de incubación se extrajo el ADN de las células adheridas a las argollas de poliestireno utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, USA) y se realizó PCR tiempo real para realizar la cuantificación absoluta del número de células correspondientes a cada especie bacteriana, se utilizó el equipo *LightCycler* 2.0 de Roche™. En primer lugar se realizó las curvas estándar para cada especie según instrucciones del fabricante. Para ello, se utilizó un producto PCR de cada especie que fue obtenido a partir de partidores específicos para cada una. Para *F. psychrophilum* se utilizaron los partidores psy-Fw y psy-Rv (Toyama y col., 1994) y para *P. fluorescens* se utilizaron los primers Ps-F y PsRv (Tabla 2). Posteriormente se realizó la purificación del producto PCR mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega) y se cuantificó la concentración de ADN utilizando el equipo TECAN Infinite F200PRO con el fin de determinar el número de copias a través de la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de copias} = \frac{\text{Concentración (ng/}\mu\text{l)}}{(\text{moléculas/}\mu\text{l}) (\text{Tamaño molecular del transcrito (pb)} * 660 \text{ g/mol}) * 6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas}}$$

Luego, con este amplificado, de un número de copias conocido, se realizaron diluciones seriadas para realizar la reacción PCR tiempo real para cada una de estas diluciones. Para la amplificación se utilizó el kit Master LightCycler de Roche. La mezcla de reacción fue la siguiente: 10 ul de master mix (el cual ya contiene Sybergreen, dNTPS y *Taq* DNA polimerasa), 0,6 ul de cada Primer, 0,2 ul de BSA, 6,6 ul de agua y 2 ul de ADN. La mezcla se depositó en capilares y se realizó en el qPCR en el equipo LightCycler de Roche. Los programas de corrida se describen en la tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de corrida de qPCR

	<i>F. psychrophilum</i>	<i>P. fluorescens</i>
<b>Pre-incubación</b>	95°C, 10 min	95°C, 10 min
<b>Amplificación</b>	95°C, 40 seg	95°C, 1 min
	60°C, 40 seg	44°C, 1 min
	72°C, 1 min	72°C, 1 min
	45 ciclos	40 ciclos
<b>Melting</b>	65°C, 10 seg	95°C, 15 seg
		60°C, 1 min

Para realizar la curva de calibración el equipo considera que una copia de ADN equivale a una célula en la muestra. El equipo mide la fluorescencia correspondiente a cada dilución con número de copias conocida y lo asocia a un número de células. Las curvas de calibrado para cada bacteria fueron ajustadas a un índice de 2. Luego que la curva de calibración fue archivada en el software del equipo, se realizó el mismo procedimiento para la muestra de ADN de concentración celular desconocida extraída de las argollas.

### **Actividad 3.5.- Efecto de la biopelícula antagónica sobre la velocidad de formación de biopelículas de *F. psychrophilum* en condiciones de flujo**

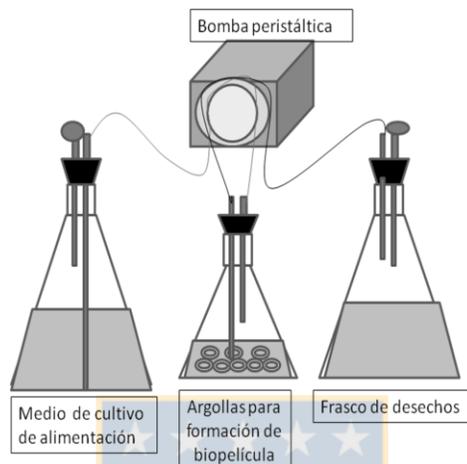
#### **3.5.1.- Instalación de un sistema de flujo tipo quimiostato**

Se preparó un sistema que permitiera una renovación constante del medio de cultivo. Como alimentación del reactor se usó caldo NB al 15% durante el crecimiento de la biopelícula. El sistema consistió de un matraz con argollas de poliestireno obtenidas como se describió en la sección 3.3.2, con 120 ml de NB al 15% con una manguera de alimentación y una de salida, ambas de silicona (Masterflex®, Coleparmer, USA) además se usó una bomba peristáltica (Masterflex® L/S model 7554-95) que regula el flujo de entrada y salida del matraz (Figura 16). El ensamblaje fue autoclavado por 20 min antes de la inoculación a excepción de las argollas que se esterilizaron por separado como se explicó anteriormente. Las argollas fueron depositadas en forma aséptica en el matraz con 120 ml de medio.

El flujo utilizado de 1,5 ml/min fue establecido considerando el criterio de Komlos y col., (2005), el cual es suficiente para no acumular células suspendidas, según la tasa de crecimiento específico de cada bacteria  $0,39 \text{ h}^{-1}$  y  $0,36 \text{ h}^{-1}$  para FF48 y *F. psychrophilum* respectivamente, la cual fue obtenida en experimentos batch de crecimiento planctónico bajo las mismas condiciones de medio nutritivo y temperatura que se usaron en los ensayos de biopelícula. La tasa de dilución en el quimiostato fue de  $0,75 \text{ h}^{-1}$ .

El quimiostato se mantuvo en una pieza con temperatura regulada a  $20^{\circ}\text{C}$  durante el transcurso del experimento (70 h). Se utilizó un inóculo bacteriano de  $1 \times 10^5$  ufc/ml para cada especie en el matraz. Manteniendo las condiciones descritas arriba de funcionamiento del quimiostato, se ensayaron dos condiciones de inoculación, en la primera condición las bacterias fueron inoculadas simultáneamente en el quimiostato y en la segunda condición se formó previamente la biopelícula antagónica durante 48 h en las argollas antes de la inoculación de *F. psychrophilum* en el quimiostato. De forma independiente, en un tercer quimiostato se formó la biopelícula de *F. psychrophilum* sin antagonista, como control. Cada experimento fue repetido 3 veces y se obtuvo el promedio de los datos y su desviación estándar.

Antes de iniciar el recambio de medio, el sistema se mantuvo en condiciones batch durante 4 h para permitir la adherencia de células al soporte y la aclimatación de las bacterias.



**Figura 16.** Esquema que muestra la instalación del sistema de flujo para formación de biopelículas.

### 3.5.2.- Cuantificación de la formación de biopelículas mixtas en condiciones de flujo en el tiempo

Dos veces al día se procedió a sacar de forma aseptica 3 argollas desde el matraz durante 70 h. Las argollas fueron lavadas en agua estéril y luego sonicadas (Branson B1510 Ultrasonic Cleaner) en dos ml de agua estéril para resuspender las células. Se realizó la extracción de ADN de las células resuspendidas mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification para posteriormente realizar la cuantificación mediante qPCR como se describió anteriormente.

Los resultados fueron graficados como  $\log \text{ cel/cm}^2$  en función del tiempo y se obtuvo la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) en la zona de crecimiento exponencial a partir de la siguiente fórmula:

$$\mu = \ln 2 / [t - t_0 / 3,3 (\log N - \log N_0)]$$

Donde  $\mu$  es la velocidad de crecimiento,  $N$  es el recuento al tiempo  $t$  y  $N_0$  es el recuento inicial al tiempo inicial  $t_0$ .

#### 4.- Análisis estadístico

El análisis de los los datos se realizó usando el software estadístico GraphPad Prism 5.0. Los resultados mostrados como media  $\pm$  D.E. (Desviación estándar), se analizaron mediante Anova y post-test Tukey o Dunnett según los datos. Las pendientes de las curvas de formación de biopelículas en quimiostato, fueron analizadas mediante análisis de regresión lineal. Una diferencia de  $p < 0,05$  fue considerada como significativa.



## VIII. RESULTADOS

### **OBJETIVO 1.- Aislamiento y selección de cepas aisladas desde pisciculturas chilena con actividad inhibitoria sobre *Flavobacterium psychrophilum***

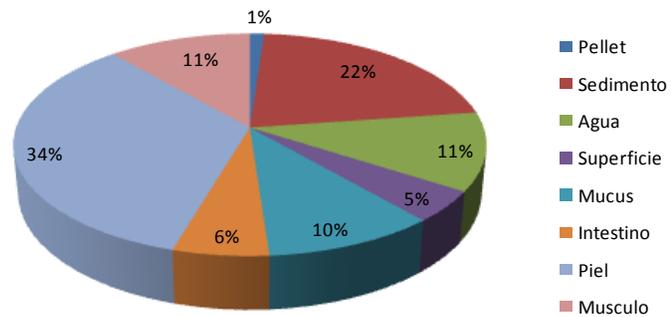
#### **1.1.- Conformación de un cepario de cepas aisladas de piscicultura**

Como primer paso en el desarrollo de este trabajo se constituyó un cepario o stock de cepas que permitiera la conservación de sus propiedades. Se logró aislar 40 cepas desde piscicultura lo que sumado a las 48 cepas donadas por el Dr. Gerardo González constituyó un cepario de 88 cepas para su posterior estudio. Estas cepas fueron guardadas en glicerol a -80°C.

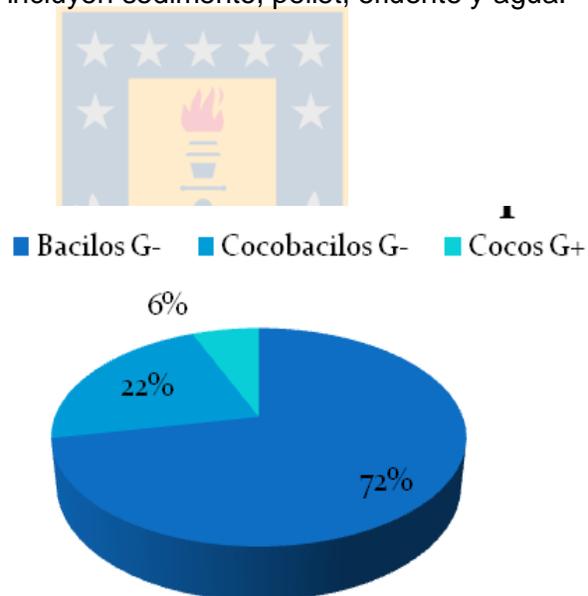
El origen de estas cepas se distribuyó de la siguiente forma:

Con respecto al lugar de muestra, la mayor parte (61%) de las 88 cepas provino desde muestras de peces, siendo la piel de pez (34%) el principal sitio de origen de las 88 cepas (Figura 17). El 39% de las cepas tuvo origen ambiental (agua, sedimento, superficie).

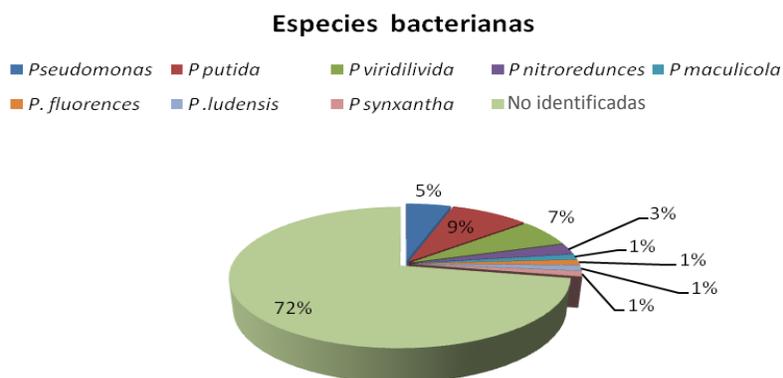
El análisis microscópico por tinción de Gram de las cepas utilizadas en este estudio permitió determinar que la mayoría de ellas (72%) correspondieron a bacilos Gram negativos (Figura 18). Las cepas donadas ya contaban con la identificación bacteriana correspondiendo principalmente al género *Pseudomonas*; sin embargo, la mayoría de las cepas no contaban con identificación (72%) (Figura 19).



**Figura 17.** Procedencia de las cepas según origen del aislamiento en el pez y en instalaciones de piscicultura. Los sitios anatómicos del pez incluyeron piel, intestino, mucus y músculo y los sitios ambientales incluyen sedimento, pellet, efluente y agua.



**Figura 18.** Análisis microscópico de las cepas utilizadas en este estudio.



**Figura 19.** Identificación de algunas cepas bacterianas incluidas en este estudio.

### 1.2.- Caracterización fenotípica de la cepa de *Flavobacterium psychrophilum*

Con el fin de conocer algunas características de la cepa 19749 se realizaron diversas pruebas bioquímicas mediante un kit rápido, no fue el objetivo llegar a una identificación mediante este sistema ya que lo más recomendado para confirmación de esta especie es el PCR de ARNr 16s. Mediante la caracterización bioquímica se pudo confirmar que se trataba de una bacteria no fermentadora de glucosa. La cepa analizada no presentó catalasa para la degradación de peróxidos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Caracterización bioquímica cepa 19749 de *F. psychrophilum*

Prueba bioquímica	Resultado
Hidrólisis de arginina	-
Utilización de tiol alifático	-
Hidrólisis de triglicéridos	-
Hidrólisis de la urea	-
Fermentación de glucosa	-
Reducción de nitrato	-
Oxidasa	-
Catalasa	-

### 1.3.- Caracterización molecular *Flavobacterium psychrophilum*

Se realizó la secuenciación de un fragmento de ADN<sub>r</sub>16s de la cepa de *F. psychrophilum*, obteniéndose un fragmento de 837 pb (Figura 20). Al realizar un alineamiento en Blast de la secuencia se obtuvo una identidad de 100% y un score de 9263 con la cepa JIP02/86, que es la cepa de *F. psychrophilum* cuyo genoma se encuentra secuenciado completamente.

>ADNr16s cepa 19749 *F. psychrophilum*

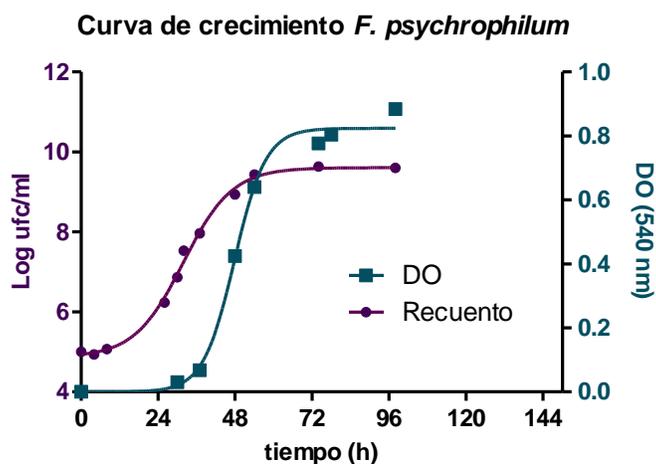
```
AGTCGAGGGGTAGAATAGCAATATTTGAGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTACCTTTACAGAGGGATAGCCCAGAGA
AATTTGGATTAATACCTCATAGTATAGTGAGTTGGCATCAACACACTATTAAGTCACAACGGTAAAAGATGAGCATGCGTCCCATTAGCTA
GTTGGTAAGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGGGTAGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACGGTCCTATGGATT
GTAAACTGCTTTTGCACAGGAAGAACTCGGTGCGTACCGGAGCTTGACGGTACTGTGAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGCCAGATAAGTCAGTGGTAAAAGCC
CATCGCTCAACGATGGAACGGCCATTGATACTGTTGGCTGAATTAATTTGGAAGTAACTAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCTTAG
AGATTACATGGAATACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTACAAATTGATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGCTGTTGGGAGCAATCTCAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGG
AGTACGTTCCGAAGAATGAAACTCAA
```

**Figura 20.** Secuencia de un fragmento de ADNr 16s de *F. psychrophilum*

#### 1.4.- Crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum*

Con el fin de conocer características del crecimiento de la bacteria se realizó su curva de crecimiento mediante recuento bacteriano en placa y densidad óptica. A partir de la curva de recuento se determinaron además parámetros cinéticos. La bacteria *F. psychrophilum* mostró su ciclo completo de crecimiento en aproximadamente 3 días, con una fase lag de aproximadamente 24 h y una fase exponencial estimada de 24 h antes de llegar a la fase estacionaria (Figura 21).

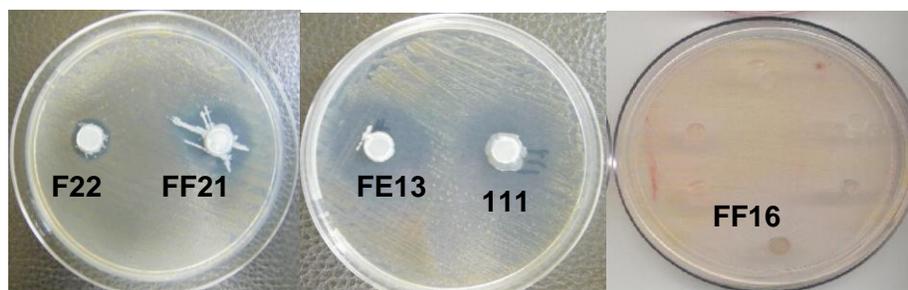
El tiempo generacional para la cepa de *F. psychrophilum* fue 2,5 h y su velocidad de crecimiento fue estimada en 0,28 h<sup>-1</sup>.



**Figura 21.** Curva de crecimiento de *F. psychrophilum* mediante densidad óptica (DO) y recuento en placa realizadas en caldo Nutritivo (NB)

### 1.5.- Selección de cepas capaces de inhibir el crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum*

Se realizó la pesquisa de actividad inhibitoria contra *F. psychrophilum* a las 88 cepas. Se detectó 9 cepas con actividad inhibitoria sobre *F. psychrophilum*, correspondiente al 11,25 % de las cepas. Estas cepas fueron denominadas como “antagonistas”. Los halos de inhibición obtenidos variaron entre 15 y 30 mm. En la figura 22 se muestran halos de inhibición. Las cepas que presentaron mayor inhibición fueron FF16 (30 mm±0), FF48 (25 mm±2,3), FE14 (23 mm±3,5) y FE13 (21 mm±1,2) (Tabla 6). La mayoría de estas cepas provenían de sedimento (3 cepas) y mucus (3 cepas).



**Figura 22.** Inhibición de *F. psychrophilum* mediante ensayo de difusión en agar. En la figura se observan los halos de inhibición producidos por las cepas depositadas en trozos de agar sobre *F. psychrophilum*.

**Tabla 6.** Cepas aisladas de piscicultura que inhibieron el crecimiento de *F. psychrophilum*

Cepa	Origen	Diámetro de inhibición (mm) ± DS
FE14	mucus	23 ±3,5
FE18	mucus	20 ±0
FF16	sedimento	30 ±0
FE13	mucus	21 ±1,2
FF48	sedimento	25 ±2,3
FF21	sedimento	20 ±1,2
F6	efluente	15 ±0
111	piel	16 ±0,6
F22	piel	14 ±1,7

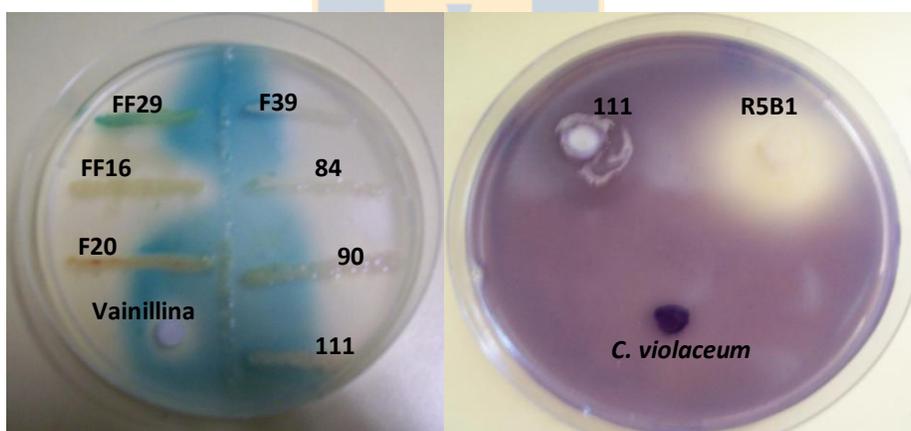
### 1.6.- Selección de cepas capaces de bloquear el quorum sensing

Del total de cepas analizadas se encontró que sólo tres cepas tenían efecto anti-quorum sensing, correspondiente a un 3,4% de las 88 cepas, estas cepas fueron incluidas en el grupo de “antagonistas”. Una de las tres cepas mostró efecto sólo sobre la cepa de *A. tumefaciens* que detecta autoinductores de cadena larga y dos de ellas mostraron este efecto sólo sobre la cepa de *C. violaceum* la cual detecta autoinductores de cadena corta

(Tabla 7). La detección del efecto se evidenció por una pérdida de la coloración de la cepa sensora como se muestra en la Figura 23. Los orígenes de estas cepas con actividad fueron variados incluyendo tanto tejidos de peces (intestino, músculo y piel) como sedimento. La cepa FF16 mostró simultáneamente inhibición de crecimiento y capacidad de interferir QS.

**Tabla 7.** Cepas que mostraron efecto anti-quorum sensing

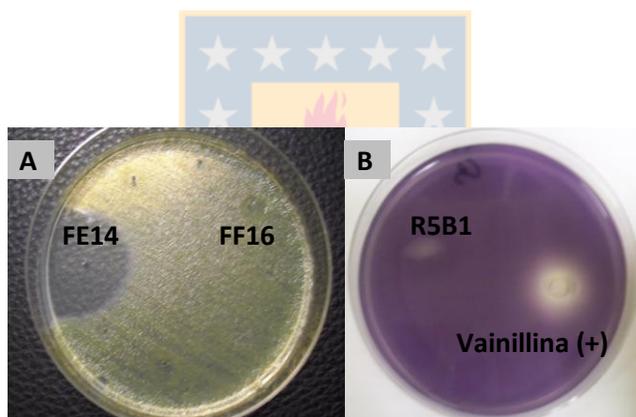
Cepa	Origen	<i>C. violaceum</i>	<i>A. tumefaciens</i>
R4A2	Piel	+	-
R5B1	Músculo	+	-
FF16	Sedimento	-	+



**Figura 23.** Bloqueo quórum sensing evidenciado en cepas sensoras. El bloqueo se observa como la pérdida de coloración de la cepa sensora que se encuentra incluida en el agar. (A) Bloqueo QS de *A. tumefaciens*, en este ensayo se observa que sólo la cepa FF16 mostró la actividad. Vainillina fue usado como control positivo (B) Bloqueo quórum sensing de *C. violaceum*. La misma cepa sensora fue utilizada como control negativo ya que no bloquea su propio quórum sensing.

### 1.7.- Producción de compuestos difusibles con actividad inhibitoria y anti-quorum sensing.

Con el objeto de determinar si la actividad inhibitoria evidenciada en los halos de inhibición era producida por compuestos inhibitorios liberados al medio, se ensayó la actividad de los sobrenadantes libres de células sobre tapiz de *F. psychrophilum* según el método de difusión en placa y el uso de reporteros QS. No se obtuvo efecto en ninguno de los dos métodos, por lo tanto se procedió a ensayar la actividad de sobrenadantes liofilizados para determinar si la ausencia de halo era debida a una baja concentración de los compuestos en el sobrenadante, en este caso se obtuvo actividad en 4 de 9 sobrenadantes en el caso de antagonismo ,FE13, FE14, FF16 y FF48, y en el caso del ensayo de bloqueo quórum sensing se observó actividad en uno de tres sobrenadantes, R5B1 (Figura 24).



**Figura 24.** Actividad antagonica de sobrenadantes liofilizados en: (A) Ensayo de difusión en agar (B) Ensayo anti-quorum sensing sobre *C. violaceum*.

### **1.8.- Cuantificación de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes**

Se ensayaron distintas diluciones de los sobrenadantes para obtener una concentración mínima inhibitoria relativa que permitiera comparar la actividad inhibitoria de las distintas cepas antagonistas y establecer una concentración adecuada para estudios posteriores sobre biopelículas. La bacteria se cultivó en medio líquido en presencia del sobrenadante y mediante densidad óptica se midió el crecimiento alcanzado después de 48 h de cultivo a cada dilución. En esta tesis se consideró como inhibición de crecimiento una densidad óptica inferior a 0,1. La concentración que se obtuvo al momento de extraer el sobrenadante antes de cualquier dilución correspondió al 100% de concentración. Siete de los 12 sobrenadantes (incluidos los inhibidores de QS) lograron inhibir el crecimiento de *F. psychrophilum* con la mínima dilución posible mediante este método que es 50%. Cuatro cepas, FF21, F22, R5B1 y R4A2 no lograron inhibir *F. psychrophilum* a las diluciones ensayadas y por eso se estima que la máxima dilución inhibitoria debe ser menor a 50%. Con este ensayo de inhibición se determinó que el efecto de los sobrenadantes se evidencia mejor cuando *F. psychrophilum* crece en medio líquido, a diferencia de cuando se probaron los sobrenadantes incluso liofilizados en ensayos con discos de agar donde sólo 4 de 9 sobrenadantes mostraron efecto inhibitorio. En la tabla 8 se muestran las distintas actividades obtenidas para los sobrenadantes y sus concentraciones mínimas inhibitorias. Los sobrenadantes que mostraron mayor actividad inhibitoria fueron F6, FE14, FF48 y FF16, los últimos tres sobrenadantes coincidentemente también mostraron inhibición en el ensayo de difusión con discos de agar cuando fueron liofilizados.

**Tabla 8.** Actividad inhibitoria de las cepas antagonistas

Cepa	Dilución máxima inhibitoria	Dilución máxima inhibitoria	Dilución subinhibitoria
FE13	1/2	50%	25%
FF16	1/4	25%	12,5%
FF21	<1/2	>50%	50%
FF48	1/8	12,5%	6,25%
F22	<1/2	>50%	50%
111	1/2	50%	25%
FE14	1/16	6,25%	3,125%
FE18	1/2	50%	25%
F6	1/16	6,25%	3,125%

### 1.9.- Selección de cepas antagonicas que inhiben la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum*

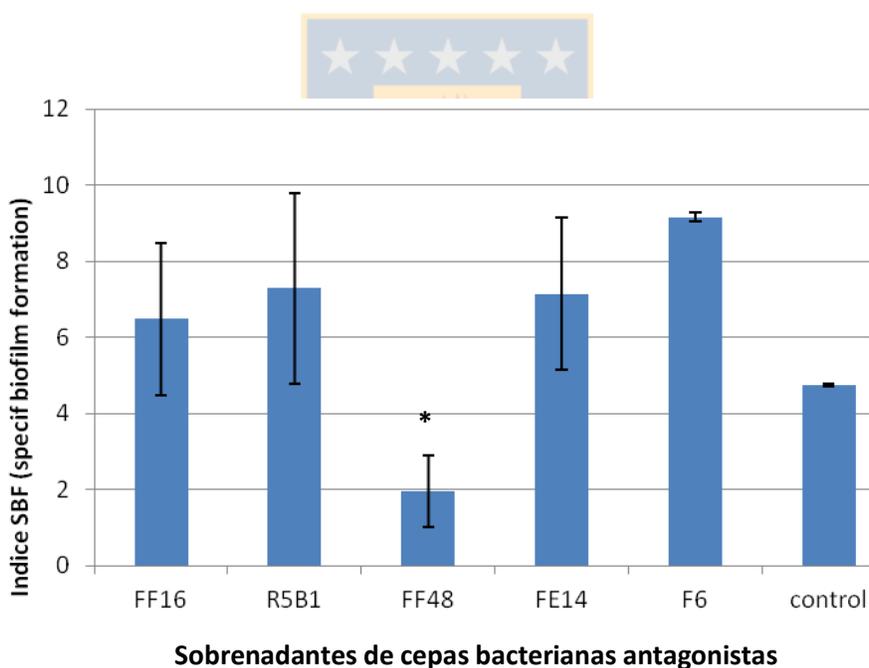
Se realizó la pesquisa de las cepas antagonistas que mostraran la mayor actividad inhibitoria en la fase planctónica y se determinó cuál de ellas afectó la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* a concentraciones sub-inhibitorias. Se evaluó también el efecto de cepas con efecto anti-quórum sensing.

Se encontró que el sobrenadante de la cepa FF48 fue el que disminuyó en mayor grado (57,4%) la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* lo que se encuentra determinado por el menor índice SBF (specific biofilm formation) que implica una mayor

localización de las células en fase planctónica que en fase adherida comparado con el control sin sobrenadante (Figura 25).

FF48 fue la cepa que inhibió mayormente la formación de biopelículas mostrando también actividad inhibitoria sobre *F. psychrophilum* en fase planctónica. FF16 por su parte si bien no mostró inhibición en el “screening” de formación de biopelículas fue una de las cepas que obtuvo mayor actividad inhibitoria en fase planctónica y presentando a la vez bloqueo quórum sensing.

A partir de los resultados de este ensayo y considerando los resultados anteriores, se determinó que las cepas FF48 y FF16 eran las cepas adecuadas para continuar con ensayos que permitieran estudiar confirmar su actividad inhibitoria sobre el crecimiento y formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.



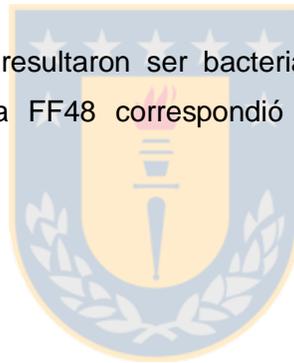
**Figura 25.** Inhibición de la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* por sobrenadantes antagónicos. El gráfico muestra el índice SBF (Specific Biofilm Formation). La diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al control se determinó por el test Anova de una vía seguido por el post- test de comparación múltiple de Dunnett.

**Objetivo 2.- Caracterizar los mecanismos de antagonismo presentes en la o las cepas que demuestren mayor poder inhibitorio sobre la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum***

### **2.1.- Caracterización bioquímica de las cepas antagonistas seleccionadas**

Con el fin de conocer características metabólicas de las bacterias seleccionadas y llegar a una identificación, se utilizó el kit rápido de identificación RapID NF plus (Remel®).

Las cepas antagonistas resultaron ser bacterias no fermentadoras y según el sistema de identificación rápida FF48 correspondió a *Pseudomonas* sp. y FF16 a *Pseudomonas putida* (Tabla 9).



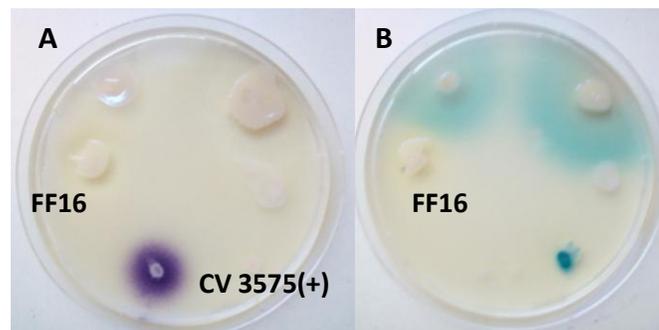
**Tabla 9.** Caracterización bioquímica de las cepas antagonistas seleccionadas

	<b>FF48</b>	<b>FF16</b>
<b>Hidrólisis de arginina</b>	-	-
<b>Utilización de tior alifático</b>	+	+
<b>Hidrólisis de triglicéridos</b>	+	-
<b>Hidrólisis de la urea</b>	-	-
<b>Hidrólisis de la gelatina</b>	+	-
<b>Fermentación de glucosa</b>	-	-
<b>Reducción de nitrato</b>	+	-
<b>Oxidasa</b>	+	+
<b>Catalasa</b>	+	+
<b>Producción de pigmentos</b>	+	+



## 2.2.- Detección de moléculas señal capaces de bloquear quórum sensing

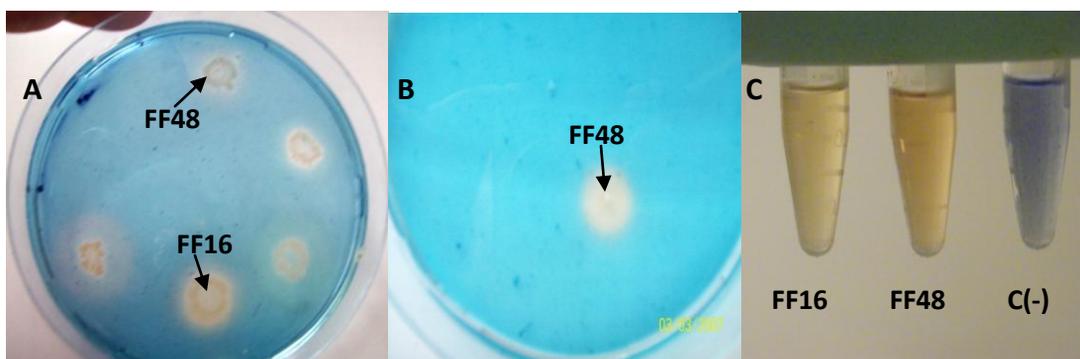
Considerando que la cepa FF16 fue capaz de bloquear el quórum-sensing, se buscó la presencia de moléculas que puedan actuar como inhibidores competitivos. El ensayo indicó ausencia de moléculas autoinductoras en la cepa antagonista FF16, tanto de cadena corta como de cadena larga (Figura 26).



**Figura 26.** Detección de moléculas autoinductoras (A) Detección de moléculas de cadena corta (B) Detección de moléculas de cadena larga

## 2.3.- Detección de sideróforos

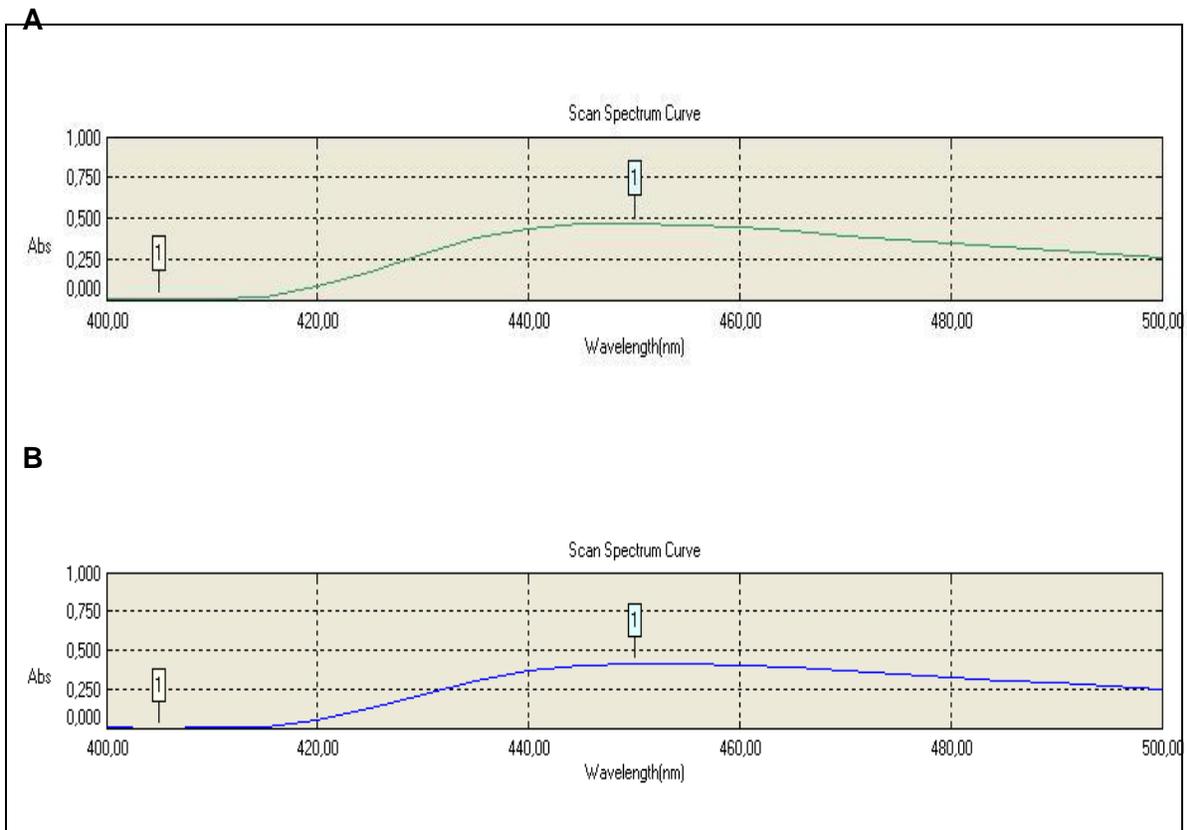
Se detectó síntesis de sideróforos en las dos cepas antagonistas FF16 y FF48 en medio CAS sólido, la detección se realizó a través de colonias de las cepas antagonistas de crecimiento (Figura 27-A), al ensayar la actividad de sobrenadantes sobre medio sólido no se observó efecto, sólo se observó reacción cuando se trabajó con los sobrenadantes liofilizados (Figura 27-B), por este motivo se ensayaron los sobrenadantes en medio CAS líquido para corroborar su actividad y en este caso si fue posible detectar sideróforos (Figura 27-C)



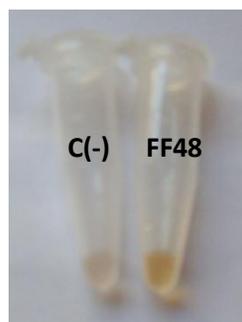
**Figura 27.** Detección de sideróforos en (A) en medio CAS sólido utilizando colonias bacterianas (B) en medio CAS sólido utilizando sobrenadantes liofilizados (C) en solución CAS utilizando sobrenadantes.

#### **2.4.- Identificación preliminar del tipo de sideróforo producido**

Las pruebas espectroscópicas para identificar el tipo de sideróforo concordaron con un sideróforo del tipo hidroxamato (Figura 28) para ambas cepas estudiadas siendo el test de Arnow negativo, detectándose una señal a 430 nm con el test de  $\text{FeCl}_3$  y resultando positivo el test tetrazolium (Figura 29).



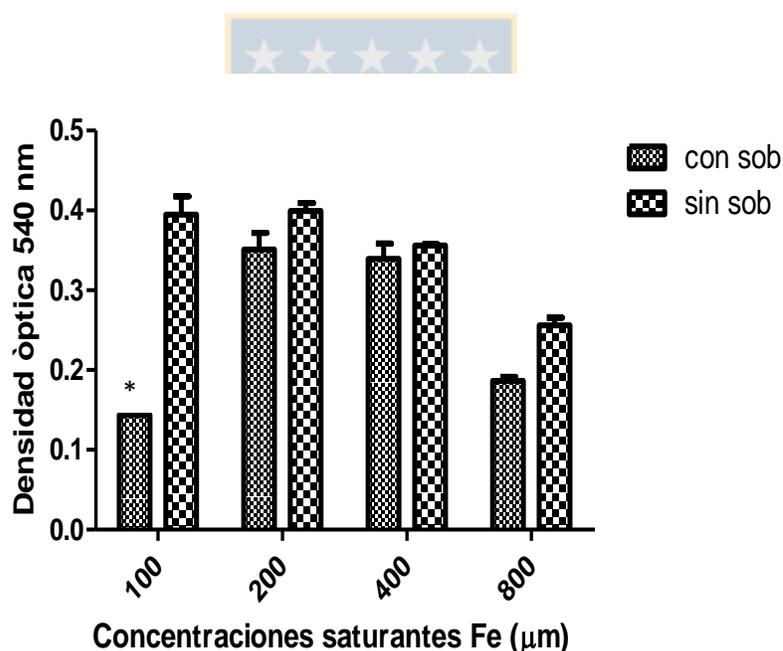
**Figura 28.** Espectrograma que muestra el pick de absorción correspondiente a un sideróforo de tipo hidroxamato para A) FF16 y B) FF48



**Figura 29.** Detección de sideróforo del tipo hidroxamato mediante el test de tetrazolium. Se observa la coloración rojiza del ensayo positivo.

## 2.5.- Efecto de la producción de sideróforos sobre la inhibición de *F. psychrophilum*

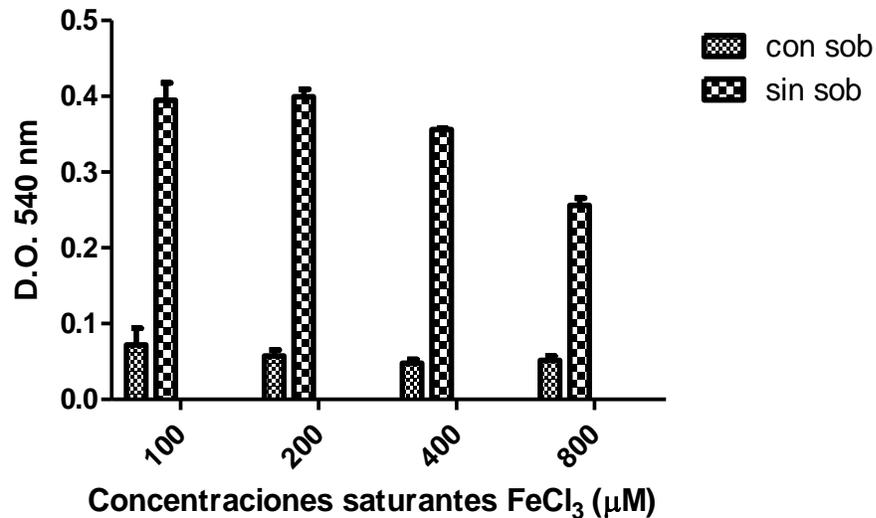
Se ensayó el efecto de los sobrenadantes antagonicos en condiciones saturantes de hierro ya que en estas condiciones si el sideróforo es responsable de la inhibición debería evidenciarse una pérdida de su actividad. Se encontró que en el caso de el sobrenadante de la cepa FF48 se perdió el efecto inhibitorio en concentración  $\geq 200 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  indicando una participación directa del sideróforo en la inhibición de *F. psychrophilum* (Figura 30). Cuando se llegó a una concentración de  $800 \mu\text{M}$  se observó que el crecimiento de *F. psychrophilum* sin sobrenadante disminuyó, lo que indica que a esta concentración el exceso de  $\text{FeCl}_3$  llega a ser tóxico de por sí sobre el crecimiento de la bacteria.



**Figura 30.** Evaluación de la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa FF48 en condiciones saturantes de hierro.

En el caso del sobrenadante de la cepa FF16 se observó que las concentraciones saturantes de  $\text{FeCl}_3$  no influyeron en la actividad inhibitoria del sobrenadante, lo que sugiere que el sideróforo no es el responsable de la inhibición de *F. psychrophilum* (Figura 31). A  $800 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  se observó un efecto de toxicidad del

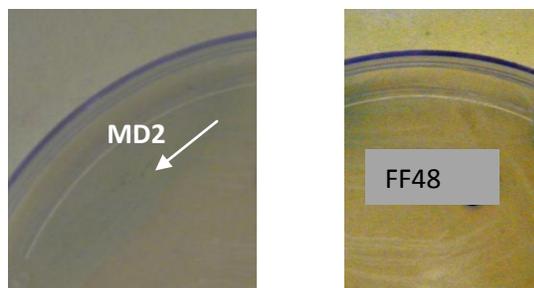
hierro sobre *F. psychrophilum*, ya que disminuye el crecimiento de *F. psychrophilum* sin sobrenadante.



**Figura 31.** Evaluación de la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa FF16 en condiciones saturantes de hierro.

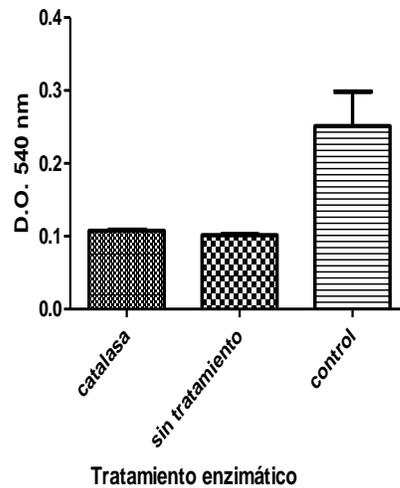
## 2.6.-Determinación de peróxidos

No se detectó producción de peróxidos en las cepas antagonistas, en la figura 32 se muestra como control la cepa MD2 que muestra la producción de peróxidos, se produce una leve tonalidad azul del cultivo en presencia de TMB, la cepa FF48 no produjo peróxidos.

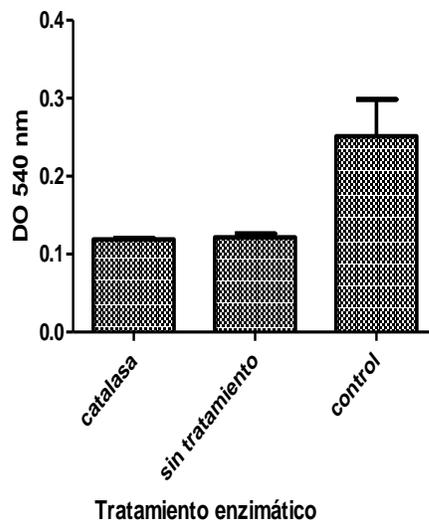


**Figura 32.** Detección de producción de peróxidos, A) la flecha indica producción de peróxidos que se visualiza con coloración azul B) ensayo de la cepa FF48.

Se confirma que el sobrenadante no contiene peróxidos y que estos compuestos no tienen influencia sobre el efecto inhibitorio de los sobrenadantes ya que al tratar los sobrenadantes con catalasa no ocurrió la pérdida de actividad inhibitoria del sobrenadante (Figura 33 y 34 )



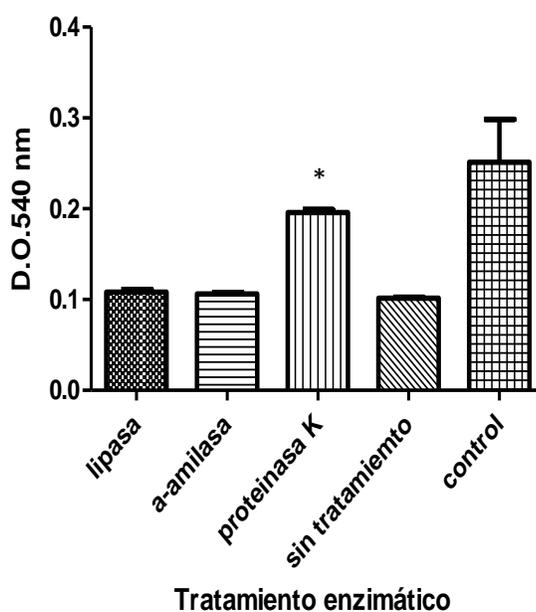
**Figura 33.** Efecto de la catalasa sobre la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa FF48 contra *F. psychrophilum*



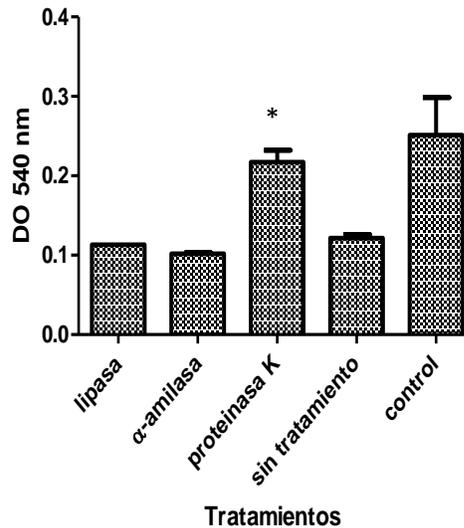
**Figura 34.** Efecto de la catalasa sobre la actividad inhibitoria del sobrenadante de la cepa FF16 contra *F. psychrophilum*

## 2.7.- Producción de otro tipo de compuestos con actividad inhibitoria

Al evaluar la presencia de moléculas como lípidos, carbohidratos y péptidos, se encontró que al tratar el sobrenadante FF48 y el FF16 con proteinasa K se produjo la disminución de su actividad inhibitoria. Cuando *F. psychrophilum* se trató con el sobrenadante FF48, la densidad óptica fue de 0,1 y cuando el sobrenadante fue tratado previamente con proteinasa K la densidad óptica aumento a 0,2, diferencia que fue estadísticamente significativa (Figura 35). En el caso del sobrenadante FF16, cuando fue aplicado sobre *F. psychrophilum* la densidad óptica fue de 0,12 en cambio cuando el sobrenadante fue tratado previamente con proteinasa K el crecimiento de *F. psychrophilum* fue mayor, alcanzando una densidad óptica de 0,22 (Figura 36), diferencia que fue también estadísticamente significativamente. Estos resultados sugieren la existencia de un compuesto de tipo peptídico. No se encontró pérdida de la actividad con los otros tratamientos enzimáticos, sin embargo, no se puede descartar con este ensayo que existan otro tipo de compuestos que no sean afectados por las enzimas utilizadas.



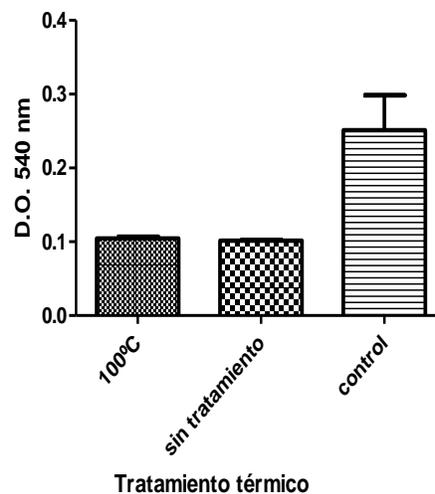
**Figura 35.** Determinación de la naturaleza bioquímica de compuestos inhibitorios sobre el crecimiento de *F. psychrophilum* en el sobrenadante de la cepa FF48



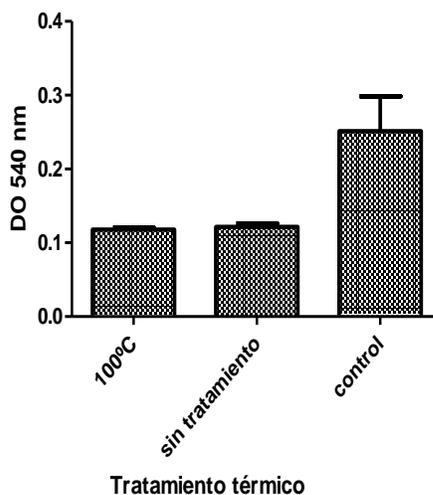
**Figura 36.** Determinación de la naturaleza bioquímica de compuestos inhibitorios sobre el crecimiento de *F. psychrophilum* en el sobrenadante de la cepa FF16

## 2.8.- Termoestabilidad de la actividad inhibitoria

Los resultados mostraron que los compuestos inhibitorios serían compuestos termoestables ya que no se observó pérdida de su actividad con el tratamiento térmico, tanto en el caso de FF48 y FF16 (Figura 37 y 38), no existiendo diferencias significativas



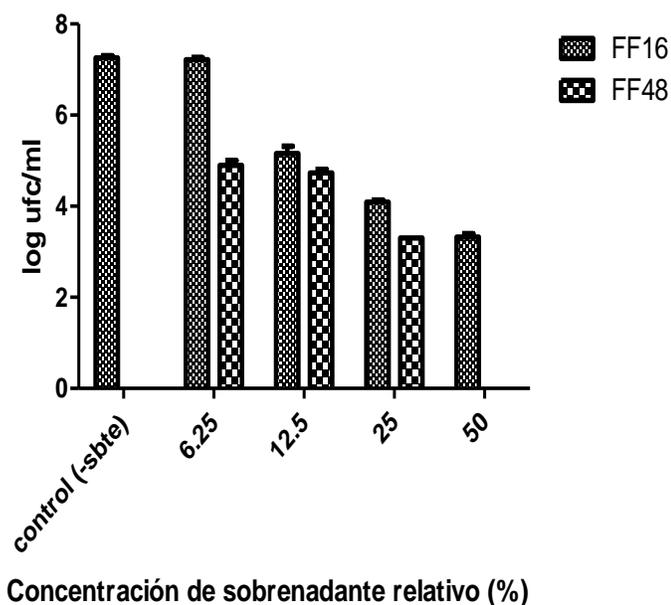
**Figura 37.** Efecto de una tratamiento térmico sobre el efecto inhibitorio del sobrenadante FF48 sobre *F. psychrophilum*



**Figura 38.** Efecto de una tratamiento térmico sobre el efecto inhibitorio del sobrenadante de la cepa FF16 sobre *F. psychrophilum*

### **2.9.- Actividad inhibitoria de los sobrenadantes de bacterias antagónicas sobre el recuento cultivable de *F. psychrophilum***

Se determinó que a una concentración relativa de 50% del sobrenadante de la cepa FF48, éste tiene una actividad bactericida en cambio el sobrenadante de la cepa FF16 a esta concentración tiene una actividad bacteriostática siendo su concentración bactericida mayor a 50% (Figura 39).



**Figura 39.** Actividad de los sobrenadantes antagonicos sobre el recuento en fase planctónica de *F. psychrophilum*

### 2.10.- Efecto del sobrenadante de las cepas antagonicas sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*

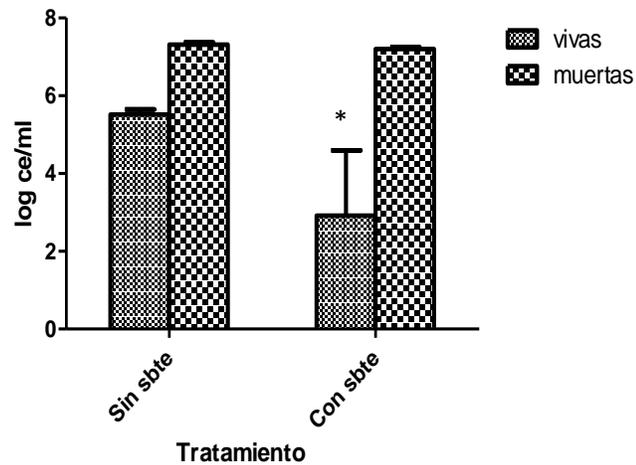
Se observó que el sobrenadante de la cepa FF48 fue capaz de disminuir en un logaritmo el número de células vivas adheridas al soporte de la microplaca (Figura 40), esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Además se disminuyó levemente el número de células cultivables adheridas al soporte, la disminución fue inferior a un logaritmo (Figura 42).

En el caso del sobrenadante de la cepa FF16 aunque no mostró una disminución en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* en el “screening” (objetivo 1) y no mostró una disminución relevante del número de células vivas adheridas (inferior a 1 log) (Figura 41), si mostró una diferencia de un poco más de dos logaritmos de las células cultivables adheridas (Figura 43), diferencia que fue significativa ( $p < 0,05$ ).

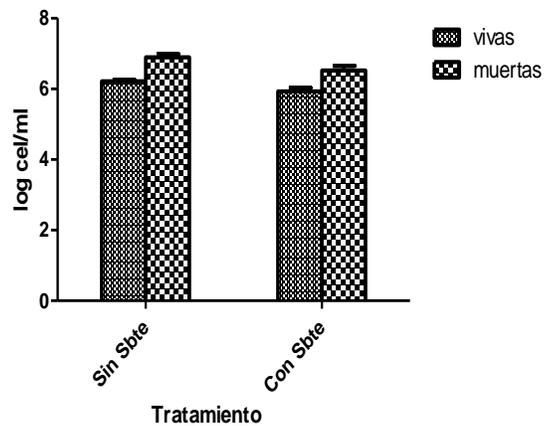
Estos resultados indican que los sobrenadantes ensayados tienen efectos diferentes, el sobrenadante de la cepa FF48 está impidiendo la adherencia de bacterias vivas. No hay un efecto notorio sobre las células vivas cultivables. En el caso de FF16,

este sobrenadante afecta la fracción de vivas cultivables, efecto que no alcanza a ser evidenciado cuando se analiza la población total de células adheridas vivas.

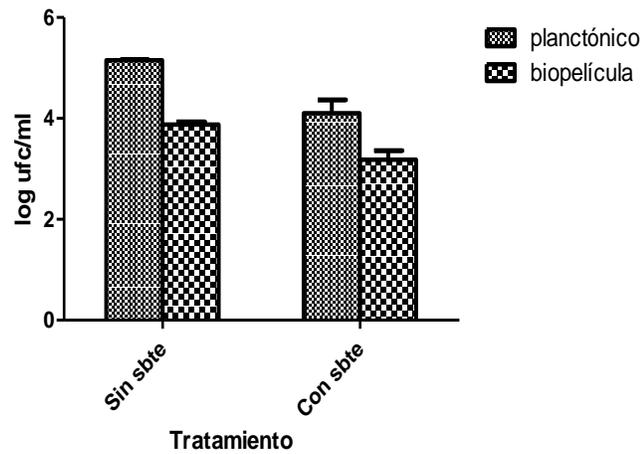
Se seleccionó por lo tanto la cepa FF48 para continuar con ensayos posteriores ya que presentó dos tipos de mecanismos de antagonismo y además mostró ser capaz de inhibir principalmente el grupo de células viables adheridas.



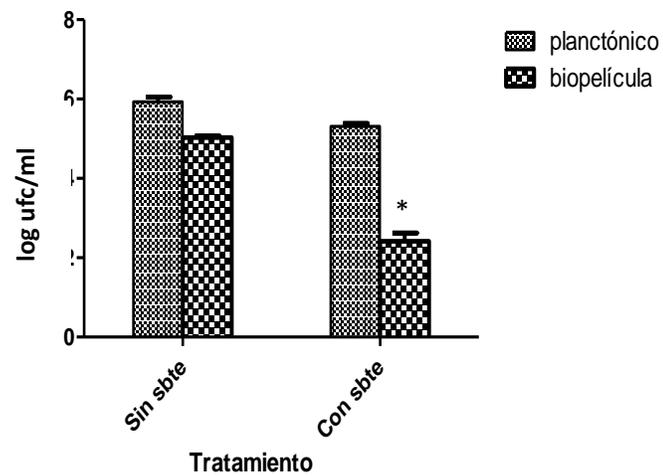
**Figura 40.** Efecto del sobrenadante de la cepa FF48 sobre la viabilidad de la biopelícula de *F. psychrophilum* en formación



**Figura 41.** Efecto del sobrenadante de la cepa FF16 sobre la viabilidad de la biopelícula de *F. psychrophilum* en formación



**Figura 42.** Efecto del sobrenadante de la cepa FF48 sobre la fracción cultivable de la biopelícula en formación de *F. psychrophilum*



**Figura 43.** Efecto del sobrenadante de la cepa FF16 sobre la fracción cultivable de la biopelícula en formación de *F. psychrophilum*

**Objetivo 3.- Determinar la capacidad de la cepa antagonista de formar una biopelícula estable que controle la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum*.**

### **3.1.- Caracterización molecular de la cepa antagonista seleccionada**

Se realizó la secuenciación de un fragmento ADN<sub>r</sub>16S de la cepa antagonista (Figura 44), al realizar un alineamiento en Blast de la secuencia se encontró un 99% de identidad y score de 1375 con *Pseudomonas fluorescens*

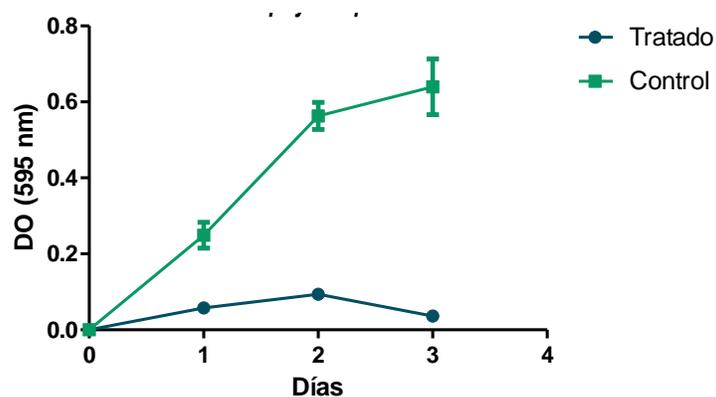
>Secuencia FF48

```
TGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGA
TAACGTTTCGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAG
GTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAG
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACC
GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTG
TTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCT
GTGTANCGGTGAAATGCGTANATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCCAAAGC
GTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGCAAACGATGTC
```

**Figura 44.** Secuencia de un fragmento de ADN<sub>r</sub>16r de la cepa FF48

### **3.2.- Efecto del sobrenadante en el tiempo sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum***

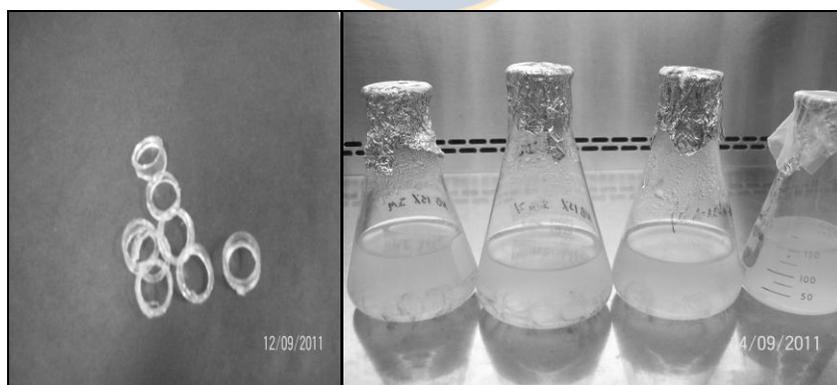
El sobrenadante de la cepa FF48 a concentraciones subinhibitorias mostró una disminución de la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* desde las 24 h de cultivo y esta inhibición se mantuvo en el tiempo, siendo la velocidad de formación de la biopelícula tratada de 0,002 h<sup>-1</sup> y del control del 0,011 h<sup>-1</sup>, correspondiendo a un 84% de inhibición, diferencia que fue estadísticamente significativa (p<0,05) (Figura 48).



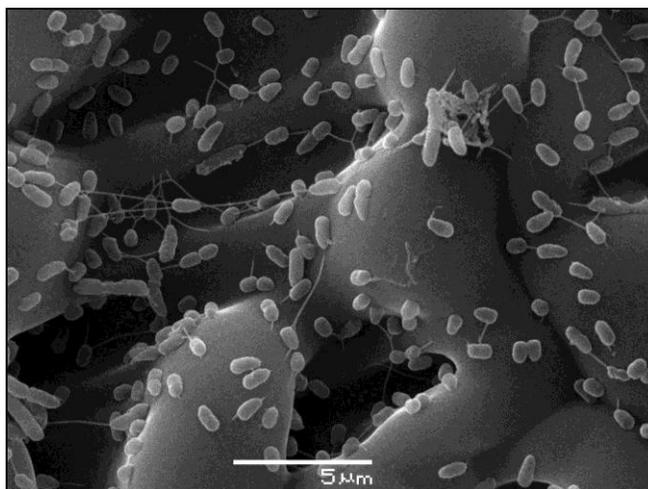
**Figura 45.** Efecto del sobrenadante FF48 sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*

### 3.3.- Formación de la biopelícula antagonista en condiciones batch

Se logró la formación de una biopelícula de la cepa antagonista FF48 en anillos de poliestireno hasta las 72 h (Figura 46). Luego esta biopelícula fue observada mediante microscopía electrónica y se encontraron células individuales adheridas en todo el soporte y comunidades bacterianas con más acumulación de células en ciertas zonas del anillo (Figura 47)



**Figura 46.** Imagen que muestra las argollas de poliestireno utilizadas y cómo éstas fueron depositadas en matraces para la formación de la biopelícula

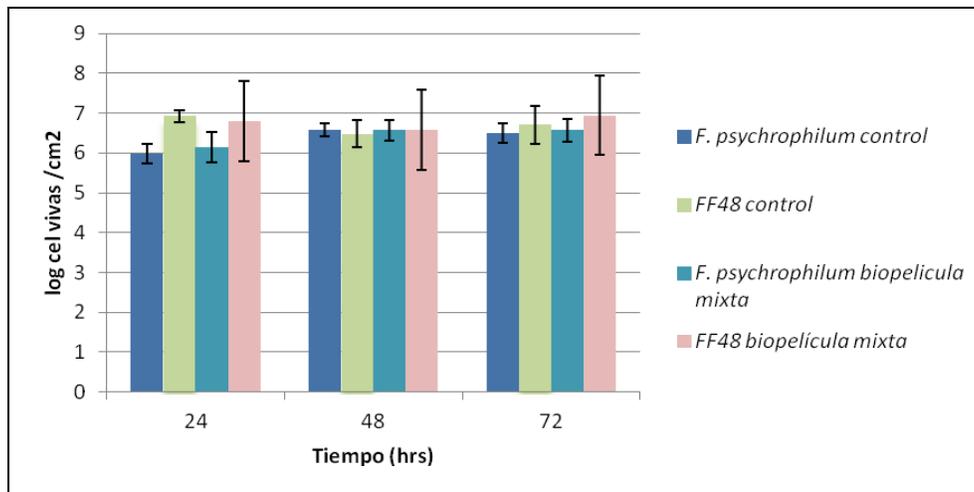


**Figura 47.** Micrografía electrónica de la biopelícula antagonista de FF48 a los 3 días de formación en soporte de poliestireno.

### 3.4.- Formación de una biopelícula mixta patógeno-antagonista en sistema batch

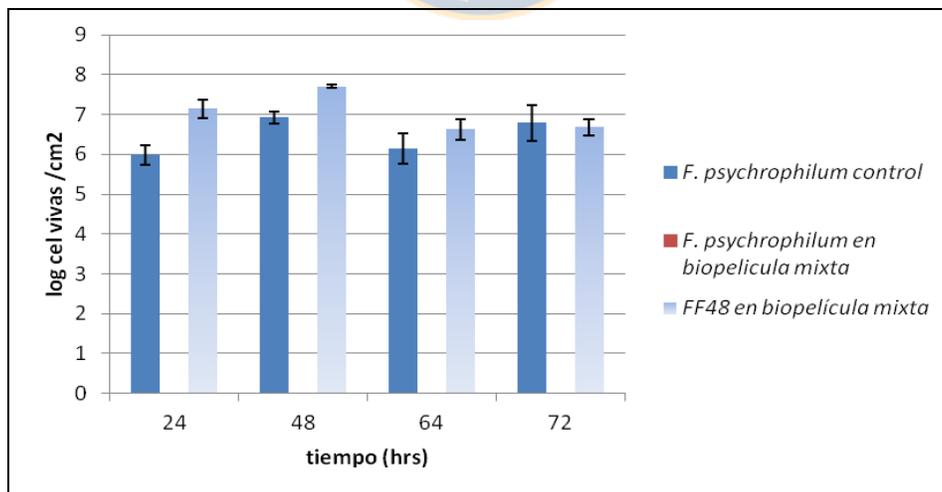
Se empleó un sistema como en el ensayo anterior en el cual se probaron dos condiciones de formación de la biopelícula mixta, una condición fue la inoculación de las cepas antagonista y patógena al mismo tiempo y la otra condición fue la formación previa de la biopelícula antagonista y la posterior inoculación de *F. psychrophilum*. Se utilizaron a modo de control la formación de la biopelícula mono-especie por separado.

Al analizar el resultado mediante tinción de células vivas se encontró que cuando se inocularon las dos bacterias al mismo tiempo, ambas cepas formaron biopelícula y la cepa antagonista no logró evitar el asentamiento de *F. psychrophilum* (Figura 48), lo que se observó a las 24, 48 y 72 h no observándose diferencia significativa en el número de células adheridas.



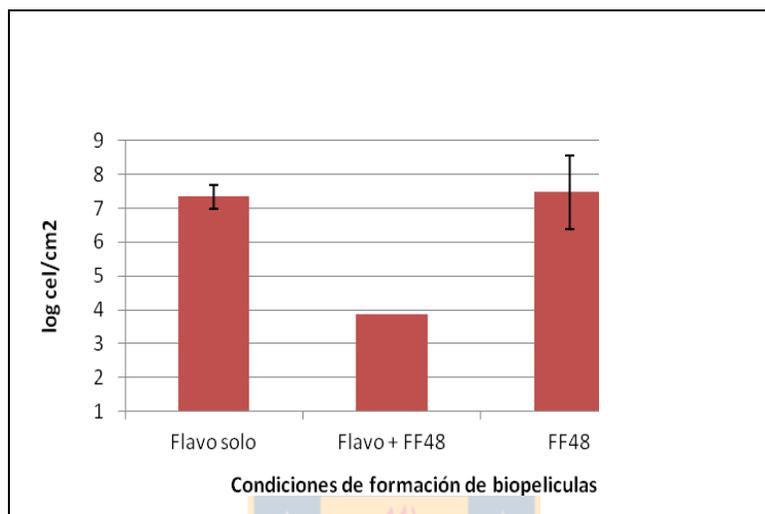
**Figura 48.** Efecto de la bacteria antagonista sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* cuando las bacterias son inoculadas al mismo tiempo en sistema batch. Los controles corresponden a las cepas formando biopelículas solas.

Cuando se formó previamente la biopelícula antagonista no se detectaron células adheridas de *F. psychrophilum*, lo que indicó que existe una inhibición de formación de biopelículas solamente cuando la biopelícula antagonista es formada previo a la inoculación de *F. psychrophilum* (Figura 49).



**Figura 49.** Efecto de la bacteria antagonista sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* cuando la biopelícula antagonista es formada previamente en sistema batch.

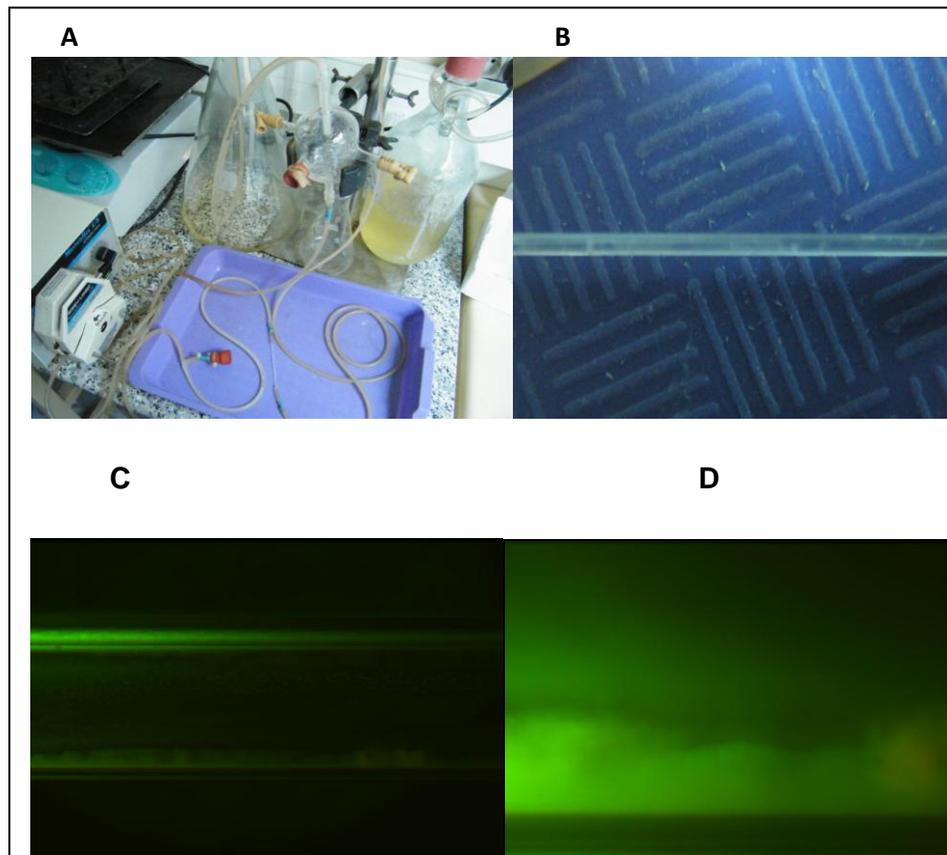
De esta última condición se realizó también la determinación mediante qPCR a las 72h y se encontró un resultado similar al obtenido mediante tinción de células vivas adheridas (Figura 50), sin embargo, en este caso se encontraron células adheridas al soporte equivalente a aproximadamente  $10^4$  cel/  $\text{cm}^2$



**Figura 50.** Efecto de una biopelícula antagonica sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* mediante PCR tiempo real

### 3.5.- Formación de una biopelícula antagonica en condiciones de flujo

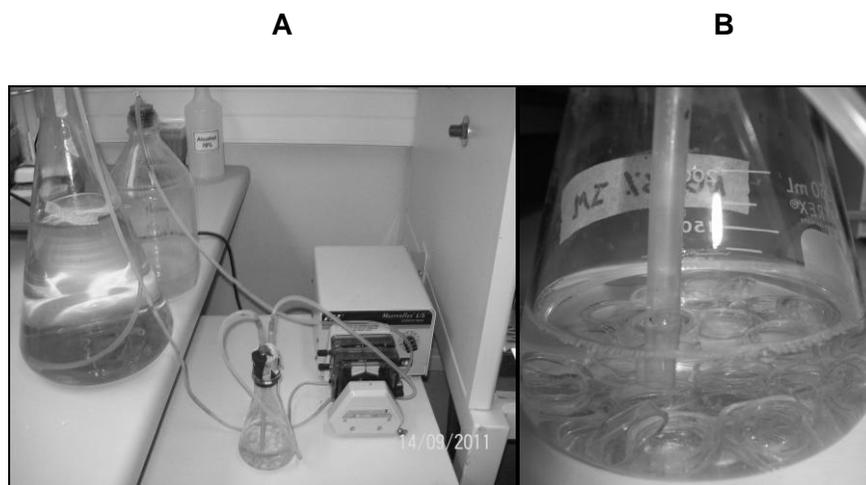
La biopelícula de la cepa FF48 se formó en condiciones de flujo constante observándose primero a simple vista la formación de la biopelícula al interior del capilar y luego mediante microscopía de epifluorescencia se pudo demostrar que la biopelícula fue estable en condiciones de flujo laminar durante los 3 días que duró el ensayo (Figura 51).



**Figura 51.** Visualización de la biopelícula antagonista en condiciones de flujo laminar mediante epifluorescencia. A) Instalación del sistema de flujo laminar B) Observación a simple vista de la formación de biopelícula al interior del capilar C) Detección de la biopelícula adherida mediante tinción BaCLight Live and Dead, la visualización se realizó en el objetivo 20X D) Visualización de la biopelícula adherida con objetivo 40X

### 3.6.- Formación de biopelículas mixtas antagonista-patógeno en condiciones de flujo

Se realizó la instalación de un sistema que permitió la renovación constante de medio (Figura 52). Al igual que en el ensayo anterior se estudiaron dos condiciones de formación de la biopelícula mixta, una condición de inoculación simultánea y una condición de pre-formación de la biopelícula antagonista. En la primera condición se realizaron tres tipos de cinéticas de formación de biopelículas, la cinética de formación de la biopelícula antagónica en la biopelícula mixta, la cinética de formación del patógeno en la biopelícula mixta y a modo de control se realizó la cinética de formación de la biopelícula del patógeno por separado sin el antagonista.

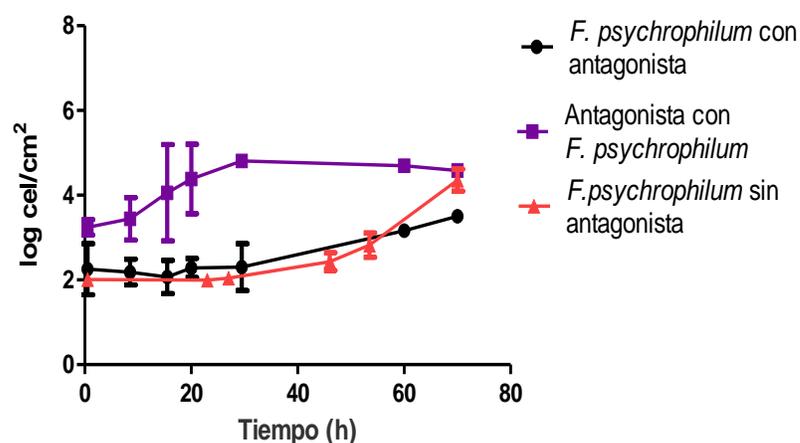


**Figura 52.** Instalación de un sistema que permite el recambio constante de medio

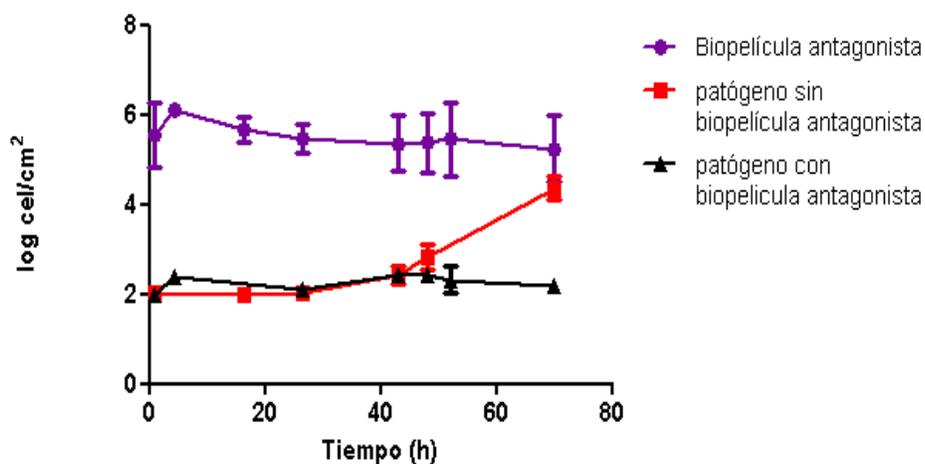
Los resultados mostraron que la bacteria antagónica comienza a formar biopelículas a las 30 h de su inoculación, alcanzando el máximo de células adheridas ( $10^5$  cel /cm<sup>2</sup>). La bacteria patógena, en cambio, comienza a formar biopelículas en el soporte después de las 30 h y llega a alcanzar un número células adheridas similar al de la bacteria antagonista ( $10^5$  cel /cm<sup>2</sup>) cuando han pasado más de 70 h (Figura 53). Los resultados indican que cuando se formaron las dos biopelículas simultáneamente, el antagonista redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* sobre el soporte, presentando éste último una tasa de crecimiento de 0,19 h<sup>-1</sup>, comparado a 0,36 h<sup>-1</sup> para *F. psychrophilum* solo sobre el soporte (Table 10). A pesar de esta importante diferencia, el antagonista no logró evitar que *F. psychrophilum*

formara biopelícula sobre el soporte y que ambas especies logran co-existir, lo que desde el punto de vista biológico implica que el patógeno pueda persistir en el ambiente. Este resultado concuerda con lo obtenido en el sistema batch.

Cuando la biopelícula antagonista se formó previamente, ésta logró inhibir la formación de bioepelículas de *F. psychrophilum* desde las 40 h de formación, que es el momento en que el patógeno comienza a formar biopelículas con mayor velocidad (Tabla 10), no detectándose aumento de células adheridas hasta pasado las 70 h, a diferencia de la condición anterior. Cabe destacar que en ambas condiciones existe una adherencia basal inespecífica cercano a  $1 \times 10^2$  cel /cm<sup>2</sup> debido a interacciones de tipo físico y no biológico de adherencia al soporte (Figura 54).



**Figura 53.** Formación de una biopelícula mixta antagonista-patógeno en condiciones de renovación constante de medio e inoculación simultánea de las cepas.



**Figura 54.** Formación de una biopelícula mixta antagonista-patógeno en condiciones de renovación constante de medio con formación previa de la biopelícula antagonista.

**Tabla 10.** Comparación de las tasas de formación de biopelículas de *F. psychrophilum* (U) para la biopelícula mono-especie y las mixtas

Biofilms	Tiempo inicial U	Tiempo final U	U	%Disminución U
<b>Mono-especie</b>				
<i>F. psychrophilum</i>	46 h	70 h	0,36 h <sup>-1</sup>	
<b>Dual-especie (tratamientos)</b>				
<i>P. fluorescens</i> vs <i>F. psychrophilum</i>	29 h	79 h	0,19 h <sup>-1</sup>	47,2 %
<i>P. fluorescens</i> vs * <i>F. psychrophilum</i>	29 h	70 h	0 h <sup>-1</sup>	100%

## IX. DISCUSIÓN

Esta tesis tuvo como objetivo desarrollar una biopelícula antagonica para evitar la adherencia del patógeno de peces, *F. psychrophilum*. En primer lugar fue necesario realizar la búsqueda de bacterias antagonicas entre un grupo de bacterias aisladas desde pisciculturas. Esta estrategia resultó efectiva y es la más recomendada por diversos autores ya que bacterias aisladas de piscicultura tienen más probabilidad de adaptarse al ambiente donde serán utilizadas como biocontrolador (Verschuere y col, 2000; Sahu y col.2008; Balcázar y col. 2006). Es importante considerar que el hecho que se hayan aislado antagonistas de piscicultura no descarta que puedan existir antagonistas en otros ambientes y también en la fracción de bacterias no cultivables, que por limitaciones de la técnica no es posible detectar.

Como patógeno se utilizó una cepa *F. psychrophilum*, la que fue debidamente caracterizada fenotípica y molecularmente, lo que permitió confirmar que se trabajaba con la especie indicada, ya que no es fácil diferenciar fenotípicamente entre especies de *Flavobacterium* sp. y se podrían generar confusiones. El crecimiento del patógeno resultó ser similar a lo reportado en la literatura, reportándose un tiempo de generación de 2 h (Nematollahi y col, 2003). El crecimiento en placa fue más lento que en medio líquido, lo que implicó cierta dificultad para los ensayos de antagonismo realizados en agar.

De las 88 cepas aisladas de piscicultura se encontró que sólo 9 lograron tener una relación antagonica con *F. psychrophilum*, lo que es un resultado esperado ya que frecuentemente el porcentaje de cepas antagonicas en este tipo de estudios usando cepas aisladas desde pisciculturas es bajo. (Kei *et al.* 2006; Hjelm *et al.* 2004. El ensayo en agar es un método sensible, fácil de realizar, rápido y económico, lo cual es una ventaja cuando se analiza un elevado número de cepas, permitiendo detectar tanto compuestos volátiles como no volátiles (Schulz *et al.* 2010), sin embargo, se debe considerar que el método tiene algunas limitaciones como la detección de sólo moléculas capaces de difundir a través del agar y preferentemente del tipo polar, por este motivo no es un método cuantitativo de actividad inhibitoria ya que el tamaño del halo de inhibición va a depender tanto de la actividad como de la difusibilidad de las moléculas, que depende a su vez, del tipo, número, tamaño y forma de las partículas (Valgas *et al.* 2007). Se trata de un método sólo de screening que enfrenta bacterias vivas, por lo tanto, el halo

de inhibición puede no sólo deberse a la producción de moléculas sino a otras situaciones como competencia por nutrientes por ejemplo, por este motivo, posterior a este ensayo debe realizarse la detección de moléculas en los sobrenadantes (Valgas et al 2007; Dopazo y col. 1988).

Además, de bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *F. psychrophilum*, considerado como antagonismo clásico, se buscaron cepas capaces de inhibir el quórum sensing, también mediante ensayo en agar. Las bacterias Gram negativas típicamente (más de 70 especies) tienen el sistema quórum sensing LuxI/R que involucra autoinductores del tipo N-acil-homoserina lactonas (AHLs) (Bruhn y col., 2005). En esta tesis se estudió este sistema que es el que correspondería a *F. psychrophilum* y a la mayoría de los patógenos de peces. Mediante ensayos con sensores de bloqueo encontramos que sólo 3 cepas resultaron positivas para este ensayo. El porcentaje fue similar al obtenido en un estudio en Actinomicetes marinos (You y col, 2007). Las cepas en esta tesis provenían de ambientes de agua dulce, piel y músculo de pez y de sedimento de piscicultura, lo cual constituye el primer reporte de bloqueo QS en cepas no patógenas aisladas de estos ambientes. Una cepa de las cuatro con actividad anti-QS, FF16, logró tener ambas propiedades (inhibición de crecimiento y bloqueo quórum sensing) lo que desde el punto de vista biotecnológico tiene importancia ya que cepas con este tipo de antagonismo podrían evitar el crecimiento planctónico y a la vez la formación de biopelículas de patógenos de peces evitando que ellos persistan en el ambiente generando infecciones recurrentes. El mecanismo de antagonismo basado en la producción de moléculas señal ha surgido con especial actividad sobre la formación de biopelículas, que es la forma más común en la que se encuentran las bacterias en la naturaleza. Además diversos genes de virulencia de patógenos, como aquellos relacionados con adhesión, producción de toxinas y sideróforos, se hallan bajo el control de QS (Schauder y Bassler, 2001; Patriquin y col., 2008).

Con respecto al bloqueo quórum sensing de *F. psychrophilum* mediante moléculas de señalización interferentes, según literatura no ha sido detectado el mecanismo funcional de quórum sensing en esta especie ya que no se ha detectado producción de AHLs utilizando biosensores (Bruhn y col., 2005), sin embargo, la secuenciación de su genoma muestra la presencia de un gen codificando para una proteína tipo LuxR que indica que si bien no sería capaz de producir AHLs por ausencia

de sintasa podría llegar a expresar el receptor siendo capaz de responder a este tipo de moléculas (Duchaud y col., 2007) y por lo tanto factible de ser inhibido. Aún si el bloqueo quórum sensing no afectara directamente a *F. psychrophilum*, da la oportunidad de inhibición de otros patógenos de peces especialmente a la forma de biopelículas.

Posteriormente, se determinó si estas actividades inhibitorias se encontraban en el sobrenadante, lo que indicaría que las bacterias producen moléculas con actividad inhibitoria que liberan al medio. Se detectó esta actividad en sólo cuatro sobrenadantes liofilizados obtenidos de las bacterias que habían mostrado inhibición en el ensayo en agar, la razón para que los otros sobrenadantes no mostraron actividad puede ser un problema de concentración o a que la competencia observada en los halos de inhibición obtenido en el ensayo en colonia se hubiera debido a una competencia por nutrientes más que por una actividad inhibitoria como ha sido reportado anteriormente (Dopazo y col, 1988). Al utilizar los sobrenadantes en un cultivo líquido de *F. psychrophilium*, se observó una actividad mucho mayor de ellos, en este caso sólo dos sobrenadantes no mostraron actividad coincidiendo con los sobrenadante liofilizados que no mostraron actividad en agar, lo que significa que estos dos sobrenadantes no contendrían moléculas inhibitorias. El hecho que en algunos sobrenadantes la actividad fuera evidenciada mucho mejor en el ensayo líquido que en agar indica que las moléculas presentes probablemente no tienen una buena difusión en agar. Las actividades de algunos sobrenadantes en ensayo líquido fueron bastante buenas llegando a mantener su actividad incluso cuando fueron diluidos 16 veces, obteniéndose una actividad similar a la informada por Ström-Bestor and Wiklund, (2011) quien obtuvo una actividad a diluciones de 8 veces y mayores.

Posteriormente, se seleccionaron los sobrenadantes con las mejores actividades inhibitorias en las condiciones de ensayo, y también el sobrenadante que mostró actividad anti-QS, y se ensayaron sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. Sólo el sobrenadante de la cepa FF48 tuvo el efecto deseado, lo que indica que esta cepa además de inhibir el crecimiento planctónico a una concentración sub-inhibitoria aún es capaz de disminuir la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. La utilización de esta cepa en el ambiente puede tener proyecciones para el control de biopelículas en pisciculturas (Zapata et al 2007), sin embargo, es necesario considerar que no siempre los resultados obtenidos *in vitro* son aplicables en terreno (Robertson et al 2000; Gram et

al 2001). Además, de la cepa FF48, se seleccionó como segunda opción, la cepa FF16 que aunque no mostró inhibir significativamente la formación de biopelículas en el “*screening*”, tiene propiedades interesantes como bloqueo QS e inhibición de crecimiento planctónico que pueden tener interesantes aplicaciones biotecnológicas

Se buscó entonces conocer en forma preliminar el tipo de moléculas antagónicas presentes en los dos sobrenadantes seleccionados. En primer lugar y antes de la caracterización molecular se identificaron fenotípicamente las bacterias antagonistas, las que correspondieron al género *Pseudomonas*. Varios estudios sobre antagonismo buscando biocontroladores de patógenos de peces han reportado el género *Pseudomonas* como un buen inhibidor tanto a nivel de patógenos de peces como de plantas (Haas 2005, Das 2006). Aunque no existen al respecto muchos trabajos sobre *F. psychrophilum*, también se ha encontrado antagonismo con cepas de *Pseudomonas sp.* (Kei 2006, Tiirola y col., 2002).

Como una de las cepas seleccionadas, FF16, fue capaz de inhibir el quórum sensing y se exploró el tipo de mecanismo involucrado. Se han propuesto tres posibles mecanismos de interferencia en diferentes etapas de la vía de señalización, estos incluyen inhibición de la biosíntesis de la molécula señal, bloqueo de la transducción por antagonistas como es el caso de las furanona y biodegradación de la molécula señal por lactonasas y acilasas (Defoirdt y col., 2004). En este trabajo se buscaron moléculas que actuaran como antagonistas de moléculas de señalización con una estructura similar a una homoseril-lactona que pudiera estar causando alguna interferencia en la señalización. El estudio con biosensores mostró que la cepa FF16 no produjo ningún tipo de molécula señal, ni de cadena corta ni de cadena larga, lo que indica que podría existir otro tipo de mecanismo de bloqueo QS involucrado. Cabe señalar que la técnica utilizada tiene algunas limitaciones cuando no se obtiene señal en el ensayo y es difícil poder descartar la producción de autoinductores, ya que existen al menos tres posibilidades: 1) El microorganismo ensayado puede que no produzca acyl-HSL bajo las condiciones de ensayo 2) Puede que la bacteria ensayada produzca un acyl-HSL que es estructuralmente diferente a las moléculas que detectan los biosensores, no siendo reconocido por ellos 3) La bacteria ensayada puede producir un acyl-HSL en concentraciones no detectable bajo las condiciones de cultivo. La determinación del

mecanismo exacto de bloqueo QS escapa a los objetivos de esta tesis y así futuros estudios permitirán clarificar cuales son las moléculas involucradas.

Se ha descrito que la producción de sideróforos es uno de los mecanismos más comunes de antagonismo en *Pseudomonas* sp a bajas concentraciones de hierro, se estudió si las bacterias seleccionadas podrían ejercer su efecto inhibitorio a través de estas moléculas. Se encontró que las dos bacterias seleccionadas producían sideróforos, las que fueron caracterizadas preliminarmente como del tipo hidroxamato. Estas moléculas podrían estar participando directamente de la inhibición a través de una actividad antibiótica (Neilands 1981), podría tratarse de un mecanismo de inhibición por competencia por hierro (Henry *et al.* 1991) o podría ocurrir que no exista un efecto de estas moléculas sobre *F. psychrophilum* ya que la sola presencia de ellas no determina un efecto sobre el patógeno, sobre todo considerando que *F. psychrophilum* también produce sideróforos y que en algunos casos el ensayo puede detectar compuestos quelantes de hierro que no son sideróforos funcionales (Varma y Chincholkar 2007). Por lo tanto, para poder entender la inhibición fue necesario aplicar los sideróforos presentes en los sobrenadantes de las bacterias antagónicas sobre *F. psychrophilum* para dilucidar si efectivamente estas moléculas tendrían participación. Se realizaron ensayos en concentraciones saturantes de hierro, asumiendo que si existe competencia por hierro, en condiciones de exceso de hierro los sideróforos no serían efectivos. Se encontró que el sobrenadante antagónico FF48 perdía su efecto antagónico desde una concentración saturante de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  lo que fue similar a lo reportado por Ström-Bestor and Wiklund, (2011) quienes también observaron una pérdida del efecto inhibitorio desde 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  a 400  $\mu\text{M}$ . El resultado indica que el mecanismo de inhibición es dependiente de hierro, la competencia en este caso donde las dos bacterias producen sideróforos podría estar dada por la distinta afinidad de estos quelantes por el hierro, ya que se ha descrito que los sideróforos de *F. psychrophilum* son del tipo catecolato y de baja afinidad por el hierro. A pesar de esta evidencia, no es posible concluir que los sideróforos sean responsables de la inhibición y se diverso autores recomiendan referirse sólo a un mecanismo dependiente de hierro (Simoes y col, 2008; Gram y col, 1999; Strom-Bestor y Wiklund, 2011). Otros estudios son necesarios para confirmar la participación de sideróforos como el uso de mutantes para la producción de sideróforos y la detección de las moléculas mediante cromatografía (Fenwick y col, 1996)

En el caso de la cepa FF16 el resultado indicó que la inhibición se produce independiente de la concentración de hierro en el medio, esto descarta el sideróforo participando en antagonismo por competencia por hierro pero no descarta un efecto antibiótico. Es importante destacar también que los sideróforos no son las únicas moléculas que produce *Pseudomonas* sp. con efecto inhibitorio y no se puede descartar que exista además de sideróforos otra molécula inhibitoria involucrada como fenacinas, floroglucinoles, pioluteorina, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos y cianida de hidrógeno. El mecanismo exacto como actúan estos compuestos no se conoce bien (Haas y Defago, 2005).

Con el fin de detectar otro tipo de compuestos se utilizaron tratamientos enzimáticos de los sobrenadantes para buscar la participación de lípidos, proteínas o carbohidratos. Los resultados sugieren la participación de un compuesto de tipo peptídico en ambos sobrenadantes, ya que al ser tratados con proteinasa K, en el caso de FF48 disminuyó su actividad antagónica en un 50% y en el caso de FF16 de 45,5%. El compuesto generado podría corresponder a un péptido antimicrobiano que se ha descrito pueden ser producidos por el género *Pseudomonas* sp. (Fountoura et al 2009; Parret et al 2002, 2005), estos péptidos son del orden de los 30 kDa. Más estudios son necesarios para determinar la estructura exacta de este compuesto, lo que implica realizar la purificación y su posterior análisis por cromatografía o resonancia magnética nuclear (Jorquera y col. 1999). Se logró determinar también que los sobrenadantes tienen una actividad inhibitoria que es termoestable y que en el caso de FF48 sería bactericida a una concentración relativa de sobrenadante del 50%, indicando la producción de un compuesto que a altas concentraciones actúa como antimicrobiano sobre fase planctónica. En cambio en FF16 la actividad fue bacteriostática a esa misma concentración relativa pudiendo tratarse de un compuesto menos potente en comparación con FF48.

Además, se buscó descartar la presencia de peróxidos lo que se logró con tratamientos del sobrenadante con catalasa y detección en agar TMB, métodos de screening altamente sensibles (Rhee et al 2010). Como era de esperar no se detectaron peróxidos ya que éstos son liberados al medio principalmente por bacterias Gram positivas.

Se determinó que los efectos producidos sobre las fracciones viables cultivables y viables no cultivables de *F. psychrophilum* son diferentes para ambos sobrenadantes, esta diferencia se puede deber a los diferentes modos de acción de los compuestos

antagónicos, ya que un mecanismo sería dependiente de hierro y de un compuesto peptídico y el otro sólo del compuesto peptídico. Además, puede estar influenciado por las diferentes poblaciones de células cultivables y no cultivables que se pueden encontrar en un cultivo de *F. psychrophilum*, se ha descrito que existe una mínima fracción de células cultivables de no más del 25%, en comparación con el número total de células vivas (Michel y col. 1999). Esto puede explicar por qué el efecto de FF16 sobre el recuento cultivable no es evidenciado en el recuento total de células vivas.

Debido a las características de los compuestos inhibitorios producidos y a los efectos producidos por los sobrenadantes, se seleccionó la cepa FF48 para el análisis final de co-formación de biopelículas con *F. psychrophilum*. En primer lugar se procedió a la secuenciación ADN<sub>r</sub>16s de la cepa seleccionada que indicó similitud con la especie *P. fluorescens*, especie que suele ser encontrada en el sitio de aislamiento que correspondió a sedimento (Nybroe et al 1990)

Luego se analizó el efecto del sobrenadante en el tiempo, resultando efectivo durante los primeros 3 días de formación de biopelículas de *F. psychrophilum*, lo que confirmó que es una cepa adecuada para el estudio de interacción durante el tiempo de formación de la biopelícula. Se encontró que el sobrenadante antagónico a concentración sub-inhibitoria relativa de 6,25% fue capaz de afectar la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*, lo que indica que aún a una concentración que permite el crecimiento planctónico, el compuesto inhibitorio disminuye la cantidad de células que logran adherirse. La explicación para este fenómeno podría ser que a esta concentración, el compuesto inhibitorio podría capturar el hierro que juega un papel importante en el proceso de formación de biopelículas sin afectar la fase planctónica como describen algunos autores (Singh et al. 2002; Ishida et al. 2011).

Posteriormente se verificó que la cepa antagonista era capaz de formar una biopelícula mediante microscopía, como se ha descrito previamente para esta especie (Baum y col., 2009). Se estudió la interacción entre la bacteria antagónica, productora de compuestos inhibitorios y la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* en sistema batch y en quimiostato. Los resultados fueron similares para ambas condiciones. Cuando ambas bacterias comienzan a adherirse a un soporte considerando la ventaja competitiva que la antagonista tiene, se encontró que ambas bacterias fueron capaces de co-existir en el soporte. Este hecho resultó similar a lo que se ha descrito previamente en co-cultivos planctónicos (Vaseeharan y Ramasamy, 2003; Gram y col., 1999) en los cuales las

bacterias antagónicas son capaces de co-existir a menos que el antagonista se inocule en una concentración mayor que el patógeno. En estudios de biopelículas mixtas también se ha observado algo similar, siendo las dos bacterias capaces de co-existir en una biopelícula cuando se inoculan simultáneamente, ya sea porque se forman microcolonias separadas sobre la superficie o una bacteria se adhiere sobre la otra (Kreth y col, 2005; Tait y Sutherland, 2002). Este fenómeno puede ser explicado porque el compuesto inhibitorio no tiene la concentración necesaria para ser efectivo o porque el tiempo no es el suficiente para que se produzca la molécula y se genere la inhibición. Durante ese tiempo puede que microcolonias de *F. psychrophilum* formen exopolisacárido que protejan a las bacterias de la acción de un compuesto inhibitorio. El resultado obtenido en esta tesis no parece estar determinado por una competencia por el nicho entre las bacterias o porque el compuesto inhibitorio tenga un efecto directo sobre el proceso de formación de biopelículas, ya que las dos bacterias son capaces de co-existir en biopelículas, es más probable que el efecto observado concuerde con un efecto sobre fase planctónica del compuesto inhibitorio. Al parecer el efecto inhibitorio no sería el mismo sobre una biopelícula en formación que sobre una biopelícula ya formada, lo que con los datos obtenidos en este trabajo no es posible corroborar ya que el sobrenadante antagónico fue ensayado sólo sobre una biopelícula en formación, no siendo el objetivo del estudio la inhibición de una biopelícula ya madura.

Cuando se formó previamente la biopelícula antagónica no se detectó la co-formación de biopelículas, lo que podría ser explicada porque las moléculas requieren una concentración adecuada para alcanzar su efecto la que sería alcanzada sólo una vez que el antagonista ya ha formado la biopelícula previo a la inoculación del antagonista. Según Kreth y col. (2008) al haber una biopelícula ya formada del antagonista se reduciría el tiempo necesario para producir el compuesto ya que éste se encontraría disponible en el medio cuando llega el patógeno. Es importante considerar que la interacción se estudió en un sistema batch donde las moléculas pueden acumularse en el medio, donde claramente existe una mayor probabilidad de conseguir la inhibición, y también en un sistema abierto donde las moléculas inhibitorias se diluyen continuamente y no es posible su acumulación. El hecho que se haya conseguido inhibición en este último sistema indica que el antagonismo estaría actuando cuando las bacterias están en estrecho contacto y formando una biopelícula. El último factor a considerar es el tipo de mecanismo involucrado, ya que si bien hay algunas evidencias de que los sideróforos jugarían un

papel importante en la formación de biopelículas es posible pensar que la participación de este mecanismo sería más importante cuando aumenta el número de bacterias antagónicas y por ende disminuye también la disponibilidad de hierro como en el caso de una biopelícula. Si se tratara de un mecanismo proteico tipo bacteriocina, este compuesto también sería más efectivo cuando se forma previamente la biopelícula antagónica porque no se alcanzan a formar microcolonias que protejan a la población susceptible de estas sustancias según lo descrito por Tait y Sutherland, (2002)

Para finalizar es importante destacar que el uso de PCR tiempo real en este estudio permitió discriminar de una manera más exacta ambas especies bacterianas a diferencia de el método tradicional de recuento en placa, que es usado frecuentemente pero que al parecer no es el más indicado para este tipo de ensayos de antagonismo ya que de por sí existe una inhibición en la placa que altera los resultados.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis se puede advertir que cuando se selecciona un biocontrolador es importante considerar la interacción que éste tendrá con el patógeno que queremos controlar a nivel de biopelículas, que es la forma como las bacteria se encuentran comúnmente en la naturaleza. Es importante también considerar el tipo de mecanismo antagónico, ya que el antagonismo debido a la producción de un antibiótico puede ocasionar resistencia y tendrá poca efectividad sobre una biopelícula madura a diferencia de una inhibición por sideróforo que no ocasionará resistencia porque se basa en la competencia por un nutriente, aunque necesitará concentraciones constantes de hierro para ser efectivo. Por último, es importante considerar el tiempo que se deja asentar el biocontrolador en el sistema antes que se vea enfrentado al patógeno como quedó demostrado en este trabajo.

La cepa FF48 seleccionada en este trabajo tiene la particularidad de inhibir tanto la fase planctónica sino que también la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*, por lo que esta cepa tienen potencialidad para ser utilizada en el biocontrol de *F. psychrophilum* y de otros patógenos acuícolas. Estudios *in vivo* permitirán comprobar la efectividad de la biopelícula antagónica.

## X. CONCLUSIONES

1. La cepa *Pseudomonas fluorescens* FF48 inhibe el crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum* en fase planctónica.
2. La cepa *Pseudomonas fluorescens* FF48 inhibe el crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum* a través de un mecanismo dependiente de hierro probablemente del tipo sideróforo
3. La biopelícula de *Pseudomonas fluorescens* FF48 evita la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum in vitro*



## XI. REFERENCIAS

Álvarez B., Secades P., Prieto M. et al (2006) A Mutation in *Flavobacterium psychrophilum* *tlpB* Inhibits Gliding Motility and Induces Biofilm Formation. *Applied Environmental Microbiology* 72(6): 4044–4053

Alvial A., Bañados F. (2006) Desafíos en la Consolidación del Cluster del Salmón Chileno: Contribución del Programa Territorial Integrado (PTI). *Revista Salmón y Ciencia* (octubre)

APHA (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Microbiological Examination*

Balcázar JL., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz JL.(2006) The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173–186

Banin E., Vasil ML., Greenberg EP. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings National Academy Science* 102(31): 11076–11081

Banin E., Brady KM., Greenberg EP. (2006) Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3):2064–2069

Banks MK., Bryers JD. (1991) Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Applied Environmental Microbiology* 57(7): 1974–9

Barnes M., Brown M. (2011) A review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. *The Open Fish Science Journal* 4:1-9

Barton L., Northup D. (2011) *Microbial Ecology*. Ed. Wiley.Blackwell. New Jersey

Baum MM., Kainović A., O'Keeffe T., Pandita R., McDonald K., Wu S., Webster P. (2009) Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiology* 9: 103 doi: 10.1186/1471-2180-9-103

Beck von Bodman S., Hayman GT., Farrand SK. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proceedings National Academy Science USA* 89(2):643-647

Bernardet J., Bowman J. (2006) The Genus *Flavobacterium* Chapter 6.4 Prokaryotes 7: 481–531

Berlutti F., Ajello M., Bosso P., Morea C., Andrea P., Giovanni A., Piera V. (2004) Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *BioMetals* 17: 271–278

Bienert GP., Schjoerring JK., Jahn TP. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 994–1003

Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. (1999) Live/dead BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37(1): 77-86

Bravo S., Dölz H., Silva M., Lagos C., Millanao A., Urbina M. (2005) Diagnostico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura chilena. Informe Final, Universidad Austral de Chile, Facultad de Pesquerías y Oceanografía, Instituto de Acuicultura, Puerto Montt, Chile

Breidenstein EB., de la Fuente-Núñez C., Hancock RE. (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology* 19(8):419-26

Bruhn J., Dalsgaard I., Nielsen K., Buchholtz C., Larsen J., Gram L. (2005) Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms* 65 (1): 43-52

Burbank DR., Shah DH., LaPatra SE., Fornshell G., Cain LD. (2011) Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 321: 185–190

Cabello FC. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8(7):1137-44

Cha C., Gao P., Chen Y., Shaw P. et al (1998) Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11(11): 1119-1129

Chakraborty R., Storey E., van der Helm D. (2007) Molecular mechanism of ferrisiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. *Biometals* 20:263–274

Christensen BB., Haagensen JA., Heydorn A., Molin S. (2002) Metabolic commensalism and competition in a two species microbial consortium. *Applied Environmental Microbiology* 68(5):2495–502

Cipriano R., Holt R., (2005) *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet No. 86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV.

Cotter P., Hill C., Ross R. (2005) Bacteriocins: Developing Innate Immunity For Food. *Nature Reviews in Microbiology* 3: 777-788

Das BK., Samal SK., Samantaray BR. et al (2006) Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 253:17-24

Da Silva R. (1996) Técnica de Microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, 1-7. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Defoirdt T., Boon N., Bossier P., Verstraete W. (2004) Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240: 69–88

Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. (2007) Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25(10): 472-479

Defoirdt T., Sorgeloos P., Bossier P. (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology* 14:251–258

Del Cerro A., Márquez I., Prieto JM. (2010) Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. *Journal of Fish Diseases* 33(4):285-91

Diels L., Lookman R. (2007) Advanced Science and Technology for Biological Decontamination of Sites Affected by Chemical and Radiological Nuclear Agents. *Microbial Systems For In-Situ Soil And Groundwater Remediation*. Ed: Springer Netherlands. Part 2, pp. 61-77

Dingding A., Parsek M. (2007) The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Current Opinion in Microbiology* 10:292–296

Dopazo CP., Lemosc MI,, Lodeiro C., Olinches JB., Barja JI., Toranzo AE. (1988) Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65:97-101

Duchaud E., Boussaha M., Loux V., Bernardet J., Michel C., Kerouault B., Mondot S., Nicolas P., Bossy R., Caron C., Bessieres P., Gibrat J., Claverol S., Dumetz F., Le Henaff M., Benmansour A. (2007) Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnology* 25(7):763-769

Eberl HJ., Collinson S. (2009) A modeling and simulation study of siderophore mediated antagonism in dual-species biofilms. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 6:30-46

Eberl HJ., Khassekhana H., Demaret L. (2010) A mixed-culture model of a probiotic biofilm control system. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 11(2): 99–118

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 85-106

Eschenbach DA., Davick PR., Williams BL., Young-Smith KS., Critchlow CM., Holmes KK. (1989) Prevalence of Hydrogen Peroxide-Producing *Lactobacillus* Species in Normal Women and Women with Bacterial Vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 278(2): 251-256

OMS (2003) Estrategia mundial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para contener la resistencia a los antimicrobianos

FAO (2010) The State of World Fisheries and Aquaculture 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy

Faraldo-Gómez J., Sansom M. (2003) Acquisition of siderophores in Gram negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:105-116

Farrand K., Qin Y., Oger P. (2002) Quorum-Sensing System of *Agrobacterium* Plasmids: Analysis and Utility Quorum Sensing and Gene Regulation. *Methods in Enzymology* 358:452-484

Fenwick B., Rider M., Liang J., Brightman A. (1996) Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. *Veterinary microbiology* 48(3-4): 315-324

Fernández A., Fernández A., Pérez M., Nieto T., Ellis A. (1998) Siderophore production by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Lack of strain specificity. *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 87-92

Fontoura R., Corralo EJ., Terra ES., Mui ES., Brandelli EA. (2009) Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:205–213

Gatesoupe F. (1997) Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10: 239-246

Gatesoupe F.J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147-265

Gillor O., Etzion A., and Riley M.A (2008) The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(4): 591–606

González G., Mella S., Zemelman R., Bello H., Domínguez M. (2004) Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile*; 132: 619-626

Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B. et al (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied Environmental Microbiology* 65(3):969-973

Gram L., Løvold T., Nielsen J., Melchiorson J., Spanggaard B. (2001) *In vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 199: 1–11

Hall-Stoodley L., Costerton JW., Stoodley P. (2004) Bacterial Biofilms: From The Natural Environment To Infectious Diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2: 95-108

Haas D., Défago G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by Fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3(4):307-19

Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4:172–177

Harrison F., Buckling A. (2009) Siderophore production and biofilm formation as linked social traits. *The ISME journal* 3: 632-634

Hassett D., Ma J., Elkins J., McDermott T., Ochsner U., West S., Huang C, Fredericks J., Burnett S., Stewart P., McFeters G., Passador L., Iglewski B. (1999) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology* 34(5): 1082-1093

Henry MB., Lynch JM., Femor TR. (1991) Role of siderophores in the biocontrol of *Pseudomonas tolaasii* by fluorescent pseudomonad antagonist. *Journal Applied Bacteriology* 70:104-106

Hense B., Kuttler C., Müller J., Rothballer M., Hartmann A., Kreft J. (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing?. *Nature Reviews Microbiology* 5: 230 – 239

Hentzer M., Givskov M. (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation* 112: 1300–1307

Hentzer M., Wu H., Andersen J., et al. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO Journal* 22: 3803

Hjelm M., Rianza A., Formoso F. et al (2004) Seasonal Incidence of Autochthonous Antagonistic *Roseobacter* spp. and *Vibrionaceae* Strains in a Turbot Larva (*Scophthalmus maximus*) Rearing System. *Applied Environmental Microbiology* 70(12):7288-7294

Hu C., Acuna-Askar K., Englande AJ. Jr. (2004) Bioremediation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) by an innovative biofilter. *Water Science and Technology* 49(1):87-94

Huang C., Shih P. (2000) Effects of quorum sensing signal molecules on the hydrogen peroxide resistance against planktonic *Pseudomonas aeruginosa* Journal of Microbiology Immunology and Infection 33:154-158

Hsu ST. et al. (2004) The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. Nature Structural and Molecular Biology 11: 963–967

Imlay JA. (2003) Pathways of oxidative damage. Annual Review of Microbiology 57:395-418

Ishida IS., Arai M., Niikawa H., Kobayashi M. (2011) Inhibitory Effect of Cyclic Trihydroxamate Siderophore, Desferrioxamine E, on the Biofilm Formation of Mycobacterium Species. Biological and Pharmaceutical Bulletin 34(6) 917-920

Jalal MA., Helm D. (1991) Isolation and spectroscopic identification of fungal siderophores. In: Winkelmann G (ed) Handbook of microbial iron chelates. CRC press, Boca Raton, Florida pp 235–269

James GA., Beaudette L., Costerton JW. (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms. Journal of Industrial Microbiology 15:257-262

Jin F., Ding Y., Ding W. et al (2011) Genetic Diversity and Phylogeny of Antagonistic Bacteria against *Phytophthora nicotianae* Isolated from Tobacco Rhizosphere. International Journal of Molecular Science 12:3055-3071

Jorquera MA., Riquelme CE., Loyola LA., Muñoz LF. (1999) Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus* Aquaculture International 7: 433–448

Jr RLK., Pratt JR. (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. Microbiological Reviews 58(4): 603–615

Kalin RM. (2004) Engineered passive bioreactive barriers: risk-managing the legacy of industrial soil and groundwater pollution. *Current Opinion in Microbiology* 7:227–238

Kei I., Yutaka N., Toshinao I. Tomoya T., Masachika M. (2006) Antagonistic Activities of Bacteria against the Pathogen of Cold-water Disease, *Flavobacterium psychrophilum*. *Umi no Kenkyu* 15(5): 417-423

King R., Flick G., Pierson M., Smith S., Boardman G., Coale C. (2004) Identification of Bacterial Pathogens in biofilms of Recirculating Aquaculture Systems. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13(1): 125-133

Komlos J., Cunningham AB., Camper AK., Sharp RR. (2005) Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. *Microbiological Ecology* 49(1):114–25

Korkea-aho TL., Heikkinen J., Thompson KD., von Wright A., Austin B. (2011) *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05044.x

Kreth J., Merritt J., Shi W., Qi F. (2005) Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm. *Journal of Bacteriology* 187(21): 7193–7203

Kreth J., Zhang Y., Herzberg M (2008) Streptococcal Antagonism In Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans* *Journal of Bacteriology* 190(13):4632–4640

Kristensen JB., Meyer RK., Laursen BS., Shipovskov S., Besenbacher F., Poulsen CH. (2008) Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biotechnology Advances* 26: 471–481

Kristensen JB., Olsen SM., Laursen BS., Kragh KM., Poulsen CH., Besenbacher F., Meyer RL (2009) Enzymatic generation of hydrogen peroxide shows promising antifouling effect. *Biofouling* 26: 2, 141 — 153

Leroy C., Delbarre C., Ghillebaert F., Compere C., Combes D. (2008) Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. *Journal of Applied Microbiology* 105(3):791-799

Madetoja J., Nyman P., Wiklund T. (2000) *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43: 27–38

Maeda M., Nogami K., Kanematsu M., Hirayama K. (1997) The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia* 358: 285–290

Mah T., O'Toole G. (2001) Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobials agents. *Trends in Microbiology* 9: 34–39

Manyak D., Weiner R., Carlson P., Quintero E. (2005) Preparation and use of biofilm-degrading, multiple-specificity, hydrolytic enzyme mixtures. US patent number US 2005/003503

May R., Vořlksch B., Kampmann G. (1997) Antagonistic Activities of Epiphytic Bacteria from Soybean Leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* *in vitro* and in planta. *Microbial Ecology* 34:118–124

McClellan K., Winson M., Fish L. et al (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143:3703-3711

McDougald D., Rice S., Kjelleberg S. (2007) Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(2): 445-453

McLean R., Pierson L., Fuqua C. (2004) A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods* 58:351-360

Michel C., Antonio D., Hedrick RP. (1999) Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum*: approach and control. *Research in Microbiology* 150:351–358

Miethke M., Marahiel MA. (2007) Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(3): 413–451

Miranda CD., Rojas R. (2007) Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture* 266(1-4):39-46

Mireles II Jr., Toguchi A., Harshey RM. (2001) *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* 183(20): 5848–5854

Møller D., Ellis A., Barnes A., Dalsgaard I. (2005) Iron acquisition mechanisms of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 28: 391–398

Montiel F., Lam M. (2001) *Manual de microbiología clínica*. Ed. Mediterraneo. Chile

Moons P., Michiels CW., Aertsen A. (2009) Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology* 35(3): 157–168

Musk DJ., Banko DA., Hergenrother PJ. (2005) Iron Salts Perturb Biofilm Formation and Disrupt Existing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry and Biology* 12: 789–796

Naclerio G., Ricca E., Sacco M., De Felice M. (1993) Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology* 59(12): 4313–4316

Neilands JB. (1981) Microbial iron compounds. *Annual Review Biochemistry* 50:715-731

Nel H., Bauer R., Wolfaardt G., Dicks L. (2002) Effect of Bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on Biofilms of *Oenococcus oeni* on a Stainless Steel Surface. *American Journal of Enology and Viticulture* 53(3): 191-196

Nematollahi A., Decostere A., Pasmans F., Haesebrouck F. (2003) *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 26: 563–574

Nilsen H., Olsen AB., Vaagnes Ø. et al (2011) Systemic *Flavobacterium psychrophilum* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) farmed in fresh brackish water in Norway. *Journal of Fish Diseases* 34: 403-408

Nybroe O., Johansen A., Laake M. (1990) Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Pseudomonas fluorescens* in sediment samples. *Letters Applied Microbiology* 11(6):293-296

Niu C., Gilbert E. (2004) Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12): 6951–6956

Rhee SG., Chang T., Jeong W., Kang D. (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and Cells* 29(6): 539-549

Parret AHA., De Mot R. (2002) Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other  $\gamma$ -proteobacteria. *Trends in Microbiology* 10(3): 107–112

Parret A., Schoofs G., Proost P., De Mot R. (2003) Plant Lectin-Like Bacteriocin from a Rhizosphere-Colonizing *Pseudomonas* Isolate. *Journal of Bacteriology* 185(3): 897–908

Parret AHA., Temmerman K., De Mot R. (2005) Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied Environmental Microbiology* 71:5197–5207 doi:10.1128/AEM.71.9.5197-5207.2005

Pascaud A., Amellal S., Soulas M., Soulas G. (2009) A fluorescence-based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil. *Journal of Microbiological Methods* 76(1): 81-87

Patriquin G., Banin E., Gilmour C., Tuchman R., Greenberg E., Poole K. (2008) Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 190: 662–671

Rao D., Webb JS., Kjelleberg S. (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied Environmental Microbiology* 71(4):1729–36

Rasmussen TB., Skindersoe ME., Bjarnsholt T., Phipps RK., Christensen KB., Jensen PO., Andersen JB., Koch B., Larsen TO., Hentzer M., Eberl L., Hoiby N., Givskov M. (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* 151: 1325–1340

Riley MA., Gordon DM. (1999) The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology* 7(3):129–33

Robertson P., O'Dowd C., Burrells C., Williams P., Austin B. (2000) Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon *Salmo salar* L. and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquaculture* 185: 235–243

Rowe MC., Withers HL., Swift S (2010) Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEMS Microbiology Letters* 307 102–109

Sadovskaya I., Vinogradov E., Li J., Hachani A., Kowalska K., Filloux A. (2010) High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated  $\beta$ -(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology* 20(7): 895-904

Sahu MK., Swarnakumar NS., Sivakumar K., Thangaradjou T., Kannan L. (2008) Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. Indian Journal of Microbiology 48(3): 299-308

Salgado (2005) Análisis del desarrollo de la salmonicultura Chilena. Proyecto de título presentado en la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, para obtener el Título de Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica De Chile

Sauer K., Camper AK., Ehrlich GD., Costerton JW., Davies DG. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. Journal of Bacteriology 184(4): 1140–1154

Schauder S., Bassler B. (2001) The languages of bacteria. Genes and Development 15: 1468 – 1480

Schulz S., Dickschat JS., Kunze B., Wagner-Dobler I., Diestel R., Sasse F. (2010) Biological Activity of Volatiles from Marine and Terrestrial Bacteria. Marine Drugs 8: 2976-2987

Schwyn B., Neilands J. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160: 47-56

SernaPesca (2011) Informe Sanitario de la Acuicultura

Shakila R., Saravanakumar R., Vyla S., Jeyasekaran G., Jasmine G. (2006) Antagonistic Activity of the Gut Microflora Isolated from Farmed Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Asian Fisheries Science 19: 247-255

Sihag RC., Sharma P. (2012) Probiotics: the new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. Journal of fisheries and aquatic sciences 7(2):72-103

Simões LC., Simões M., Vieira MJ. (2007) Biofilm Interactions between Distinct Bacterial Genera Isolated from Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* 73(19): 6192–6200

Simões M., Simões L., Pereira M., Vieira M. (2008) Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms. *Biofouling* 24(5): 339–349

Singh PK., Parsek MR., Greenberg EP., Welsh MJ. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417: 552-555

Stewart P., Franklin M. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 6: 199-210

Ström-Bestor M., Wiklund T. (2011) Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro*. *Journal of Fish Diseases* 34(4):255–264

Sun J., Daniel R., Wagner-Dobler I., Zeng A. (2004) Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evolutionary Biology* 4: 36-47

Sundell K., Wiklund T. (2011) Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 34(5): 373-383

Stewart P., Costerton J. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135–138

Ström-Bestor M., Wiklund T. (2011) Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. On *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro*. *Journal of Fish Diseases* 34(4):255-264

Swift S., Karlyshev A., Fish L., Durant E., Winson M., Chhabra S., Williams P., Macintyre S., Stewart G. (1997) Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-

acylhomoserine lactone signal molecules. *Journal of Bacteriology* 179 (17): 5271-528

Swift S., Lynch M., Fish L. et al (1999) Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection Immunology* 67: 5192- 5199

Tait K., Sutherland I. (2002) Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 93. 345–352

Tiirola M., Tellervo E., Rintamäki-Kinnunen P., Kulomaa M. (2002) Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 51: 93–100

Toyama T., Kita-Tsukamoto K., Wakabayashi H. (1994) Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology* 9: 271–275

Valdebenito S., Avendaño-Herrera R. (2009) Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of Fish Diseases* 32: 321–333

Valgas C. Machado de Souza S., Smânia Elza FA., Smânia A. (2007) Screening Methods To Determine Antibacterial Activity Of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 369-380

Varma A., Chincholkar SB. (2007) *Microbial Siderophores*. Springer, pp 248

Vaseeharan B., Ramasamy P. (2003) Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* 36: 83–87

Verschuere L., Rombaut G., Zorruelos P., Verstraete W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 655-671

Wandersman C., Delepelaire P. (2004) Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Reviews Microbiology* 58:611–47

Waters C., Bassler B. (2005) Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Reviews Cell Development Biology* 21: 319–346

Wilson M., Abergel R., Raymond K., Arceneaux J., Rowe B. (2006) Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 (1): 320-325

Wooldridge K., Williams P. (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:325–348

Yao W., Yue D., Yong Z., YangBo H., BaoYu Y., ShiYun C. (2007) Effects of quorum sensing autoinducer degradation gene on virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sciences in China Series C Life Sciences* 50 (3): 385-391

Yasuda K., Taga N. (1980) A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *La Mer Bulletin* 18:53–62

You J., Cao L., Liu G., Zhou S., Tan H., Lin Y. (2005) Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(5): 679-682

You J., Xue X., Cao L., Lu X., Wang J., Zhang L., Zhou S. (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbial and Cell Physiology* 76 (5): 1137-1144

Zapata M., Silva S., Luza Y., Wilkens M., Riquelme C. (2007) The inhibitory effect of biofilms produced by wild bacterial isolates to the larval settlement of the fouling ascidia *Ciona intestinalis* and *Pyura praeputialis*. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(1):149-159

