

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

MICROFLORA EN OSTRAS CHILENAS Y SU INCIDENCIA EN LA COLONIZACIÓN POR VIBRIOS PATÓGENOS Y EN LA DESCOMPOSICIÓN POST COSECHA

Tesis Entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al
grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Por

Jaime Moisés Romero Ormazábal

2002

Director de Tesis Dr. Romilio Espejo

INFORME DE APROBACION .	1
AGRADECIMIENTOS .	3
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA .	5
RESUMEN .	7
SUMMARY . .	9
INTRODUCCIÓN .	11
MATERIALES Y MÉTODOS .	15
RESULTADOS . .	19
1. Tamaño de la microflora bacteriana en ostras y el efecto de la depuración sobre carga bacteriana en ostras . .	19
1.1. Tamaño de la microflora .	19
1.2. Microflora remanente luego de la depuración . .	21
2. Composición de la microflora de la ostra chilena . .	25
2.1. Bacterias cultivables en ostras chilenas .	25
2.2. Bacterias no cultivables en ostras chilenas .	27
3. Participación de la microflora en el proceso de descomposición en ostras chilenas. . .	33
3.1. Evolución de la carga bacteriana durante guarda . .	33
3.2. Cambios en la composición de la comunidad bacteriana durante guarda .	34
3.3. Identificación y caracterización de la bacteria abundante en ostras descompuestas. . .	35
4. Polimorfismo del gen 16S rDNA observado por formación de heterodupletes en productos de amplificación en cepas del género <i>Vibrio</i> . .	39
4.1. Polimorfismo en cepas tipo del género <i>Vibrio</i> . .	39
4.2. Polimorfismo en <i>Vibrios</i> aislados de ostras .	41
DISCUSIÓN .	45
Tamaño de la microflora. .	45
Cambios en la carga bacteriana durante la depuración .	46

Bacterias cultivables .	47
Comparación de la fracción cultivable y la comunidad total .	47
Bacterias no cultivables . .	47
Participación de la microflora en la descomposición . .	48
Polimorfismo del gen 16S rDNA observado por formación de heterodupletes en productos de amplificación en cepas del género <i>Vibrio</i>. .	49
CONCLUSIONES . .	51
BIBLIOGRAFÍA .	53
ANEXOS .	59
Anexo 1 . .	59

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

JAIME MOISÉS ROMERO ORMAZÁBAL

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de agosto de 2002.

Director de Tesis:

Dr Romilio Espejo:

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes

Dr. Davor Cotoras

Dr. Carlos Jerez

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

El Dr. Romilio Espejo Torres por su constante apoyo y confianza y por la motivación para realizar y terminar esta tesis.

Mis compañeros de equipo Claudia Moreno, Narjol González y Alicia Cabello por su amistad, colaboración y gran dedicación.

Mis compañeros de laboratorio Mónica Vásquez, Paulina Uribe y Carol Grüttner por su asistencia y a todo el personal del INTA por su cooperación.

Al Dr. Juan Pedro Laclette por su apoyo y recepción en su laboratorio.

A mis amigos, en especial a Carlos, Haydeé y Mayra.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) por su financiamiento a través de las becas Regulares de Doctorado y Término de Tesis.

Tesis financiada por el Proyecto FONDECYT 2000064 de Doctorado.

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

DNA	Ácido desorribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
HMA	Ensayo de migración del heteroduplex
UFC	Unidades formadoras de colonias
SW	Agua de mar artificial
RFLP	Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción

RESUMEN

Las ostras constituyen un importante producto de exportación y de consumo interno. Estos bivalvos se consumen crudos y enteros, con toda su carga bacteriana, que en algunos casos puede incluir vibrios patógenos. La carga bacteriana consiste de bacterias autóctonas y alóctonas. Las bacterias autóctonas constituyen la microflora normal, que puede tener importantes interacciones con la ostra. Un mayor conocimiento de la ecología de la microflora bacteriana en ostras contribuiría al entendimiento del rol de la microflora en la digestión, metabolismo y protección contra patógenos. Este conocimiento podría ser aplicado para mejorar la productividad y calidad sanitaria de las ostras.

En este trabajo se describen los conocimientos adquiridos en el estudio de la microflora de la ostra chilena (*Tiostrea chilensis*). Las poblaciones bacterianas más abundantes en la ostra fueron descritas a través de las técnicas moleculares. Los componentes de la fracción cultivable también se describen, aunque estos representaron una pequeña proporción del total. Se estudiaron dos fenómenos importantes que se relacionan con la microflora bacteriana en ostras: la depuración y la descomposición. Por otra parte, se describe la existencia de polimorfismo en el 16S rDNA en cepas del género *Vibrio*, dado que en una misma bacteria puede existir más de una secuencia de 16S rDNA, lo que aumentaría aparentemente la diversidad en la muestra analizada.

Este estudio permitió definir que la comunidad bacteriana que constituye la microflora total en la ostra alcanza niveles de 10^{10} bacterias/g por microscopía de epifluorescencia. Sin embargo, la fracción cultivable representó menos del 0,1% del total de las bacterias observadas por microscopía. Dentro de la fracción cultivable las poblaciones más abundantes correspondieron a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*. La composición de la comunidad bacteriana, independientemente de su capacidad para crecer en medios de cultivo, fue ensayada por dos métodos comúnmente usados para la caracterización genética de comunidades bacterianas. Uno fue el análisis de las secuencias nucleotídicas del 16S rDNA y el otro fue el estudio del tamaño de la región intergénica entre los genes 16S y 23S rDNA, también llamada espaciador ribosomal. Este último método es menos informativo, pero es más fácil de realizar. El patrón de los espaciadores bacterianos en una comunidad es obtenido por amplificación por PCR del DNA extraído directamente de la muestra y posterior separación por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

En la mayoría de las ostras, los patrones de espaciadores presentaban un producto importante de aproximadamente 1.000 pb, sugiriendo que una especie bacteriana con ese espaciador, era un componente dominante en la microflora de las ostras. El 16S rDNA contiguo a este espaciador fue posteriormente secuenciado y analizado por BlastN, resultando que este espaciador correspondía a bacterias del género *Staphylococcus*.

El análisis de RFLP del producto de amplificación de los 16S rDNA obtenidos desde ostras, mostró la existencia de un patrón prevalente, indicando que una especie particular era relativamente abundante en ostras. El clonamiento y secuenciación del 16S rDNA con este patrón permitió determinar que este 16S rDNA correspondía a bacterias del género *Arcobacter*.

La discrepancia encontrada entre ambos métodos, se atribuyó a la baja eficiencia de amplificación del espaciador ribosomal en las especies relacionadas con *Arcobacter*, como consecuencia del pobre alineamiento del primer reverso empleado en esas reacciones. Por lo tanto, bacterias relacionadas con *Arcobacter* pueden ser un componente común de la microflora de la ostra.

La depuración es un proceso empleado para reducir el número de bacterias peligrosas en los bivalvos. Para aprender más acerca del efecto de la depuración sobre la carga bacteriana, se midieron y caracterizaron las bacterias liberadas desde la ostra durante este proceso. La depuración liberó el 30% del total de UFC presentes en ostras, pero sólo un 0,5% de las bacterias totales observadas por microscopía de epifluorescencia. La comparación entre las bacterias liberadas y aquellas que permanecen en la ostra, a través de su patrón de espaciadores 16S-23S rDNA mostró que ambos grupos eran muy diferentes. Estos resultados indicaron que después de la depuración, la mayoría de las bacterias permanecen en las ostras y que la pequeña fracción liberada corresponde a un selecto grupo de cepas dentro de una comunidad más compleja.

Las ostras al igual que otros productos del mar, son muy susceptibles a la descomposición. Para identificar las bacterias relacionadas con la descomposición de las ostras, se siguieron los cambios en la carga y en la composición que ocurren durante el almacenamiento. El análisis molecular de la comunidad, reveló que una población particular registró un notable aumento. Estas bacterias portaban un espaciador 16S-23S rDNA de 400 pb y se demostró que ellas correspondían a cepas marinas que requerían sales para crecer y cuya secuencia de 16S rDNA los asociaba a *Pseudoalteromonas* spp.

Por otra parte, el análisis de los 16S rDNAs amplificados desde una única colonia de cepas *Vibrios* de colección, reveló la existencia de heterogeneidad intragenómica (polimorfismo) cercana al 2% en todas las cepas tipo analizadas. Este polimorfismo fue detectado por la visualización de heterodupletes producidos después de la amplificación por PCR de los 16S rDNA de las cepas analizadas, una metodología que permitió examinar una gran cantidad de aislados. El polimorfismo resultó una propiedad común en cepas del género *Vibrio*, dado que en todas y cada una de este género, que fueron aisladas desde ostras, se observaron 16S rDNA polimórficos. Los sitios polimórficos se concentraron en una región del 16S reconocida como variable.

SUMMARY

Oysters are an important seafood for exportation and internal demand. Oysters are the habitat for a large number of marine bacterial species. Some of these bacterial species may cause infections with serious consequences in the oysters and in human consumers. Understanding of the ecology of these bacteria inhabiting these bivalves, can help to improve both the management of hatcheries for higher productivity and the safety of oysters as food.

In this work, we used molecular tools and culture media to study the microflora of oysters (*Tiostrea chilensis*). Our results allowed to estimate the bacterial load in oysters. A value of 10^{10} bacterias/g was obtained by epifluorescence microscopy. However, recoverable counts in marine agar were less than 0.1% of the putative viable bacteria observed by microscopy. Within this cultivable fraction, the most common isolated strains were related to genera *Pseudoalteromonas* and *Vibrio*. Consistently, the electrophoretic mobility of the 16S-23S rDNA spacers of the total bacterial DNA extracted from oysters had a very different pattern from that obtained from the bacterial cultures. Analysis of bacterial DNA obtained from individual oysters showed the presence of some spacers in most of the oysters examined. These spacers may belong to bacteria of a common microflora which are non-cultivable in marine agar. We conclude that most bacterial strains present in oysters are not cultivable in marine agar.

Community composition, independently of their capacity to grow in culture media, was assessed by analysis of the 16S rDNA and its neighboring 16S-23S rDNA intergenic region, obtained through PCR amplifications on total DNA purified from homogenates of complete oysters. Analysis of the electrophoretic mobility of the 16S-23S rDNA spacers, showed the presence of a major product of about 1,000 bp in most of the sampled oysters, suggesting that a bacterial species with this size of spacer was a dominant component in the oyster microflora. Subsequent sequencing and BlastN analysis of a region of the neighbor 16S rDNA, indicated that this spacer corresponded to a species related to the genus *Staphylococcus*. RFLP of the PCR amplification product of the 16S rDNA showed a prevailing pattern, indicating that a particular species of bacteria was relatively abundant in depurated oysters. Cloning and sequencing of the 16S rDNA with the prevailing RFLP pattern, allowed to determine that this rRNA was related to genus *Arcobacter*. This discrepancy seems to be due to a low amplification efficiency for the spacer region of the *Arcobacter*-related species, due to poor annealing of the reverse primer in the PCR. *Arcobacter* is probably an important component of the normal microflora in the gastrointestinal tract of oysters.

Depuration is usually employed to release potentially harmful bacteria from shellfish. To learn more about the effect of depuration on the bacterial load, we measured and characterized the bacteria released from the oyster during this procedure. Depuration released 30% of the total colony forming units found in the oyster but only 0.5% of the total bacteria observed by epifluorescence microscopy. Comparison of the released bacteria with those remaining in the oyster, by their 16S-23S rDNA spacer regions, showed that these two groups were very different. These findings indicate that after depuration most of the bacteria remain in the oyster and that only a minor fraction, consisting mainly of cultivable bacteria, is eliminated.

To identify bacteria related with spoilage in oysters, changes in both the load and composition of the bacterial community occurring upon storage were followed. Oyster spoilage was accompanied by a 100-fold increase in the number of CFU. Molecular analysis revealed that a large proportion of the bacteria present in spoiled oysters possessed an intergenic 16S-23S

rDNA spacer of approximately 400 bp. These strains were found to be salt requiring marine *Pseudoalteromonas* spp and were likely present in oysters prior to harvest.

Analysis of the 16S rDNAs obtained from cultures of single colonies of either type collection strains or environmental strains of the genus *Vibrio* revealed the presence of polymorphism in every one of the strains examined. Polymorphism was detected by visualization of heteroduplexes produced after 16S rDNA PCR amplification, a procedure that allows for the screening of a large number of isolates. The nucleotide sequences revealed differences of up to 2% among 16S rDNAs from the same strain. Polymorphic sites were concentrated in a recognized variable. This divergence could be the result of either a selection process or a lateral transference of independently evolved genes.

INTRODUCCIÓN

Los animales portan una gran cantidad de microorganismos que puedan llegar a formar complejas comunidades, especialmente en el tracto intestinal. Se conoce como microflora normal a aquella población de microorganismos que no causa daños al hospedero, a pesar de estar en continuo contacto con sus tejidos. A esta microflora se le atribuyen efectos benéficos para el hospedero. La microflora normal del tracto digestivo participaría en la nutrición complementando procesos de digestión o contribuyendo al metabolismo. La microflora normal también jugaría un papel protector al prevenir la colonización por patógenos, controlando su crecimiento y modulando el sistema inmune del hospedero. La composición de la microflora en un determinado hospedero, probablemente depende de las propiedades del hospedero, su historial de contactos con bacterias colonizadoras, su dieta y las condiciones ambientales que prevalecen en su habitat (Savage 1977, Kirjavainen y Gibson 1999).

En ostras se ha descrito que la cantidad de bacterias, medida como unidades formadoras de colonias (UFC), alcanza las 10^3 a 10^5 por gramo de tejido blando (De Paola y cols., 1990; Wright y cols., 1996). Estas bacterias corresponderían tanto a microflora normal como a bacterias presentes en la comida ingerida recientemente (Vanderzant y Thompson 1973; Cook 1991). La flora bacteriana en ostras ha sido descrita a través de caracterización fenotípica de las cepas aisladas en cultivo, generalmente, en agar marino. *Vibrio* y *Pseudomonas* spp. son los géneros más comúnmente aislados desde ostras, constituyendo el 20 a 30% del total de UFC observadas en estos bivalvos (Colwell y Liston 1960; Murchelano y Brown 1968; Kueh y Chan 1985). La carga de vibrios depende de factores ambientales (Kaspar y Tamplin 1993) y del estado de salud

del bivalvo. La presencia de parásitos, por ejemplo, puede aumentar la cantidad de vibrios (Tall y cols., 1999). Entre las especies de *Vibrios* encontradas en ostras, existen importantes patógenos como *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* que son observados con frecuencia (De Paola y cols., 1990; Kaspar y Tamplin 1993; Cook 1994; Food and Drug Administration 1995, Wright y cols., 1996; Motes y cols., 1998). La caracterización de bacterias en ostras se ha limitado a aquellas capaces de crecer en medios de cultivo convencionales y es probable que cepas que puedan ser muy importantes no sean detectadas por esta aproximación. Esta situación ha sido descrita en comunidades bacterianas de diferentes habitats (Amman y cols., 1995; Ueda y cols., 1999; Suau y cols., 1999) pero que no ha podido ser cultivada. Un ejemplo de bacteria no cultivable observada en ostras es *Cristispira pectineus*, una espiroqueta que es identificada por su forma y tamaño en asociación con el estilo cristalino (Margulis y cols., 1990; Paster y cols., 1996).

Actualmente, la disponibilidad de métodos para la detección y caracterización genética de bacterias en forma independiente de su habilidad de crecer en medios de cultivo, ofrece la oportunidad de caracterizar la microflora bacteriana de diferentes especies animales, incluyendo las ostras, independientemente de su capacidad de crecer en medios de cultivo (Amman y cols., 1995). Dos métodos comúnmente usados para la caracterización genética de comunidades bacterianas son el análisis de las secuencias nucleotídicas del 16S rDNA (Schmidt y cols., 1991) y el estudio del tamaño de la región intergénica entre los genes 16S y 23S rDNA, también llamada espaciador ribosomal (Gurtler y Stanisich 1996; Jensen y Strauss 1993). Este último método es menos informativo, pero es más fácil de realizar. El patrón de los espaciadores bacterianos en una comunidad es obtenido por amplificación por PCR del DNA extraído directamente de la muestra y posterior separación por tamaño mediante electroforesis en gel. El patrón obtenido permite observar cambios en la comunidad bacteriana producidos en el tiempo o por la influencia de diversos factores.

El conocimiento de la ecología de la microflora de la ostra ayudaría a entender el probable rol de estas bacterias en procesos como la digestión y la protección contra patógenos. Esto podría mejorar los manejos en las zonas de cultivo de estos bivalvos, de modo de evitar la colonización por parte de patógenos. Podría además ayudar a evitar la colonización por vibrios patógenos para los humanos que las consumen. Es necesario resaltar que una adecuada descripción de la microflora requiere: a) que el método de detección sea capaz de revelar la presencia de bacterias independientemente de su capacidad para crecer *in vitro*, b) que la estrategia excluya las bacterias alóctonas o en tránsito, y c) que se identifiquen las bacterias que están presentes en la mayoría de los individuos hospederos.

Los bivalvos filtran grandes volúmenes de agua atrapando las partículas suspendidas y las sustancias disueltas que son su fuente de alimento. Los patógenos presentes en esta agua pueden ser filtrados y concentrados por las ostras. Debido a que a menudo las ostras se consumen crudas y enteras, incluyendo su tracto gastrointestinal con todo su contenido bacteriano, estos moluscos son considerados como alimentos de cierto riesgo (Richards 1991). Para asegurar la inocuidad, los bivalvos son generalmente depurados. La depuración puede ser definida como el proceso por el cual los bivalvos cosechados

son colocados en plantas que contienen agua limpia y donde los moluscos pueden purgar sus contenidos gastrointestinales bajo condiciones controladas. Se ha descrito que la depuración puede reducir el número de indicadores fecales en moluscos moderadamente contaminados (Power y Collins 1990). La efectividad de la depuración depende de variables como el nivel de contaminación y el estado fisiológico del bivalvo, la temperatura, la turbidez y la salinidad del agua de la planta (Fleet 1978). Aunque la depuración ha demostrado ser útil para reducir varias especies bacterianas (Son y Fleet 1980; Rowse y Fleet 1984), los vibrios indígenas del ambiente marino parecen ser difíciles de eliminar (Murphree y Tamplin 1995; Marino y cols., 1999). Las reducciones reportadas en los diversos estudios se han estimado sólo considerando conteos de UFC (Fleet 1978; Son y Fleet 1980; Rowse y Fleet 1984; Richards 1991), por lo cual se desconoce el efecto de la depuración sobre la comunidad bacteriana total presente en las ostras, que puede estar conformada en gran parte por bacterias no cultivables como en muchos organismos (Amman y cols., 1995; Franks y cols., 1998)

Otro problema relacionado con el consumo de ostras es su fácil descomposición. La descomposición es generalmente el resultado del crecimiento de microorganismos. En la carne y en pescados, las bacterias usan glucosa y lactato como sustratos iniciales para proliferar hasta una densidad celular capaz de generar síntomas de descomposición (Gill 1996; Koutsoumanis y Nychas 1999). Las ostras contienen grandes cantidades de carbohidratos (mayoritariamente glicógeno) que podría ser usado de una forma similar por las bacterias para iniciar la proliferación celular. Sin embargo, la descomposición en ostras probablemente procede por un mecanismo diferente al de carnes y pescados. Tan pronto como son cosechadas, las ostras cierran sus valvas para evitar la deshidratación, lo cual se traduce en un menor intercambio de gases. El metabolismo persistente aunque reducido, genera una condición de hipoxia. En esta condición el patrón de la descomposición es probablemente fermentativo (Jackson y cols., 1997). Consecuentemente, las bacterias asociadas con la descomposición en ostras y en otros bivalvos, podrían ser diferentes a aquellas asociadas a la descomposición oxidativa de peces y crustáceos. En ostras vivas, se ha demostrado que el número de UFC aumenta durante el almacenamiento (Hoff y cols., 1967 a,b), pero las bacterias responsables de la descomposición no han sido identificadas. Un mayor conocimiento en este fenómeno podría ser un gran aporte para preservar las cualidades organolépticas de las ostras y para mejorar la calidad sanitaria, puesto que se ha reportado que vibrios patógenos como *V. vulnificus*, aumentan durante el almacenamiento (Kaspar y Tamplin 1993; Cook 1994). El entendimiento de la descomposición en ostras requiere una descripción de la microflora original y la dinámica poblacional durante el almacenamiento.

La descripción de la microflora bacteriana se basa en gran parte en el análisis de la secuencia de los 16S rDNA de las bacterias. La aceptación del 16S rDNA como una buena herramienta para establecer relaciones filogenéticas, se ha basado entre otras premisas en que las múltiples copias de rRNA presentes en un único organismo son idénticas (Amman y cols., 1995; Gray y cols., 1984). Esta premisa parece ser válida para algunas especies bacterianas, pero no para otras. Por una parte, entre los genomas bacterianos secuenciados existen algunas cepas que no presentan polimorfismo entre los 16S rDNA de sus múltiples operones ribosomales. Ejemplos de estos son: *Treponema*

pallidum, *Xylella fastidiosa*, *Synechocystis* PCC6803, con 2 operones; *Campylobacter jejuni*, con 3, *Neisseria meningitidis* con 4, y *Haemophilus influenzae* con 6 operones ribosomales. Por otra parte, *Helicobacter pylori* y *Ureaplasma urealyticum* con 2, *Escherichia coli* con 7, *Vibrio cholerae* con 8 y *Bacillus subtilis* con 10 operones muestran diferencias entre los 16S rDNAs en los diferentes operones que fluctúan entre 0,6 y 2% (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.tigr.org). El polimorfismo en el gen 16S rDNA ha sido reportado en *E. coli* cepa PK3 (Cilia y cols., 1996), *Paenibacillus polymyxa* (Ulrich y cols., 1996), *Mycobacterium celatum* (Reischl y cols., 1998), *Thermobispora bispora* (Wang y cols., 1997), *Streptomyces* (Ueda y cols., 1999), y en *Thermomonospora chromogena* (Yap y cols., 1999). Falta aún por determinar cuán general o común es el polimorfismo. Este conocimiento permitirá una mejor interpretación de las observaciones de secuencias 16S rDNA en comunidades bacterianas.

En el género *Vibrio* existe un gran número de especies cercanamente relacionadas con 16S rDNA cuyas secuencias difieren entre 1 a 6% (Dorsch y cols., 1992; Ruimy y cols., 1994). Además, en este género se ha descrito la presencia de varios operones ribosomales (Yamaichi y cols., 1999). *V. fischeri* y *V. harveyi* contiene 8-11 operones (Lamfrom y cols., 1978; Wolfe y Haywood, 1993; Fegatella y cols., 1998). Estas bacterias propias del ambiente marino comparten hábitats similares donde ellas podrían intercambiar genes (incluyendo genes ribosomales) a través de bacteriófagos, presentes en grandes cantidades en el agua de mar. Este es el caso de *Vibrio cholerae* (Wommack y Colwell, 2000).

En este trabajo se describen los conocimientos adquiridos en el estudio de la microflora de la ostra chilena (*Tiostrea chilensis*). Las poblaciones bacterianas más abundantes en la ostra fueron descritas a través de las técnicas moleculares. Los componentes de la fracción cultivable también se describen, aunque estos representaron menos del 0,1% del total de las bacterias observadas por microscopía. El recuento de la carga bacteriana total y el efecto del proceso de depuración también son presentados. Los cambios en la comunidad y en la carga bacteriana durante el almacenamiento, son descritos en relación a poblaciones asociadas al fenómeno de la descomposición. Por otra parte, se describe la existencia de polimorfismo en el 16S rDNA en cepas del género *Vibrio*, dado que en una misma bacteria puede existir más de una secuencia de 16S rDNA, lo que aumentaría aparentemente la diversidad en la muestra analizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y cosecha de las ostras. Los ejemplares de ostra chilena (*Tiostrea chilensis*, Philippi 1845) se obtuvieron desde los cultivos "Quihua" (Calbuco, 41 latitud Sur) e "Hidrocultivos" (Horcón 32 latitud Sur). Las cosechas se efectuaron en diferentes períodos entre Agosto de 1999 y Diciembre de 2001. Los ejemplares seleccionados estaban saludables y tenían tamaños homogéneos.

Depuración. Las ostras (30 ejemplares) se depuraron por dos horas en un tanque que contenía 6 L de agua de mar artificial (SW) (30 ‰ de salinidad), con una recirculación de 200 mL/min a través de filtros seriados de 20, 5 y 0,2 mm. Las ostras individuales empleadas en los estudios de depuración se trataron individualmente en recipientes pequeños con 300 mL de agua de mar artificial y con recirculación de 100 mL/min a través del mismo sistema de filtros seriados. Los sistemas de depuración contaban con una unidad de control de temperatura y todas las experiencias se efectuaron a 16°C. Los parámetros de la depuración se fijaron considerando las guías de la Food and Drug Administration (FDA 1995).

Almacenamiento. Las ostras depuradas y no depuradas se almacenaron a temperatura ambiente (18°C), hasta ser analizadas a las 4, 25 y 100 horas después de la cosecha. Se usaron grupos o "pooles" de tres ostras en cada tiempo de guarda analizado.

Preparación de homogenizado de ostra. Las ostras se abrieron y su cuerpo completo fue picado finamente y pesado. Se agregó SW estéril y fría hasta completar una mezcla del 40% p/v. Esta mezcla se homogenizó en baño de hielo empleando el homogenizador

Tissue Tearor (TM, modelo 985-370, Biospec Products Inc. Wi. USA) a máxima velocidad por 3 min.

Cepas bacterianas. Cepas tipo del género *Vibrio*: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. alginolyticus* ATCC 17749 se adquirieron directamente de la colección ATCC. La cepa *V. cholerae* ISP NO 01 se adquirió en el Instituto de Salud Pública, Chile. Los aislados se obtuvieron desde colonias en agar marino inoculado con homogenizados de ostras colectadas en Calbuco (Octubre 1999) y en ostras descompuestas (Horcón, Octubre 2000).

Recuento de bacterias totales. El número de bacterias totales presentes en las diferentes muestras (ostras, filtros, agua de mar) se determinó por microscopía de epifluorescencia. Diluciones seriadas del homogenizado de ostras (40%) se observaron al microscopio luego de teñir con naranja de acridina (concentración final 1 mg/mL). También se determinó las bacterias viables empleando el kit Live/Dead[®] *Bac light* (Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, U.S.A.). Este kit contiene Syto9 como un marcador de viabilidad y yoduro de propidio (PI) como marcador de células con compromiso en la integridad de sus membranas. Estos compuestos se usaron a una concentración de 15 mM para Syto 9 y 30 mM para PI. Ambos se agregan simultáneamente y se incuban 10 a 15 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Syto 9 penetra en las bacterias vivas y éstas se tiñen de verde, mientras que PI penetra en las bacterias muertas (con membrana dañada) y las tiñe de naranja. Las partículas se contaron en una cámara de Petroff-Hausser.

Recuento de bacterias cultivables. Para examinar las bacterias cultivables, las muestras se diluyeron y 0,1 mL de las diluciones se plaquearon sobre agar marino y se incubaron a 17°C en condiciones aerobias (Collins y cols., 1991). En algunas ocasiones estas placas se incubaron también en condiciones microaerofilicas y anaerobias empleando los kits Merck Anaerocult A kit y Anaerocult C kit pack. La presencia de posibles vibrios patógenos se examinó por el crecimiento de colonias en placas de agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS, Merck) incubadas a 37°C (Murphree y Tamplin 1995; Wright y cols., 1996).

Inactivación. Para analizar la posible inactivación de las bacterias durante la preparación del homogenizado de ostra, diluciones seriadas de *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749 (10^8 to 10^{10} vibrios por gramo) se agregaron sobre las ostras finamente picadas y los homogenizados se prepararon como se describió anteriormente. Estos homogenizados se dejaron 30 min a temperatura ambiente antes que se plaqueras las diluciones seriadas.

Caracterización fenotípica. Las cepas se caracterizaron usando pruebas fenotípicas que implican fermentación o utilización de azúcares como lo describen Smibert y Krieg (1994). Los flagelos se visualizaron mediante tinción con Nano Orange kit (Molecular Probes Inc.) según el protocolo descrito por Grossart y cols., (2000).

Extracción de DNA. Para extraer el DNA bacteriano desde la ostra, los homogenizados se diluyeron al 8% (P/V) con TEx10, (0,1 M Tris, 0,01 M EDTA, pH 8,0), 0,15 M NaCl, se trataron con SDS al 1% y se incubaron a 70°C por 20 min. Este lisado se extrajo primero con fenol y luego con una mezcla de fenol:cloroformo (1:1). El DNA

presente en la fase acuosa se precipitó con etanol, se resuspendió en agua y se trató con RNAsa (100 mg/mL) a 37°C por 2 h y luego con proteinasa K (10 mg/mL) a 37°C por 1 h. Tras un tratamiento adicional con fenol:cloroformo y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), el DNA en la fase acuosa se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol. El pellet se lavó una vez con etanol 70% y luego se resuspendió en agua destilada estéril. Para extraer DNA de las bacterias cultivables, las placas de agar marino que contenían entre 100-200 colonias (UFC) se lavaron dos veces con TEx10, 0,15M NaCl. A esta suspensión se agregaba SDS (final 1%) y se sometía al tratamiento de los homogenizados de ostras.

Amplificación por PCR usando una única colonia. Cepas aisladas o de colección se sembraron por agotamiento en estrías en agar marino. Una única colonia de estas placas fue picada y resuspendida en 50mL de TE y esta suspensión fue hervida por 15 min. El lisado se centrifugó a 5.000 xg por 30 s y 1,5 mL del sobrenadante fue usado en amplificaciones por PCR.

Amplificación por PCR y análisis de los productos. La amplificación de los espaciadores ribosomales 16S-23S rDNA se efectuó como lo describe Espejo y Romero (1997) usando los partidores G1 y L1 descritos por Jensen y cols., (1993). La amplificación del 16S rDNA entre las posiciones 27 y 1492, se realizó empleando los partidores 27F y 1492R descritos por De Long (1992) como lo indica Espejo y cols., (1998). La amplificación del 16S rDNA conjuntamente con su espaciador contiguo se efectuó como lo describe Pizarro y cols., (1996) usando los partidores 27F y L1. Para la purificación de este último amplicón, los productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%; la banda del tamaño esperado de 2,5 Kb fue escindida del gel. Posteriormente, el DNA fue extraído de la agarosa por centrifugación a través de lana de vidrio a 12.000xg durante 20 s en una microcentrífuga y el extracto se diluyó 1:200 en agua destilada, del cual 15mL se usaron en las subsecuentes amplificaciones por PCR. Los productos de amplificación se examinaron tras electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata como describe lo Pizarro y cols., (1996).

Ensayo de movilidad del heteroduplete (HMA). Los amplificados de 16S rDNA de las colonias aisladas o cepas tipo se analizaron por HMA según describe lo Espejo y cols., (1998). En breve, los 16S rDNA en diferentes combinaciones se denaturaron a 98°C por 3 min y se renaturaron a 70°C por 2h. La movilidad electroforética del homoduplete y el heteroduplete se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata como ya se mencionó (ver Anexo 1).

Análisis de restricción de los productos de PCR. Los productos de amplificación de 16S rDNA se digirieron directamente con 1,5 U de las enzimas de restricción *AluI*, *RsaI* y *HaeIII* (Gibco) durante 3h a 37°C. Los productos de amplificación de los espaciadores se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, al 1%. Los productos de 400 pb provenientes de los homogenizados, fracción cultivable y colonias aisladas fueron escindidos del gel. Subsecuentemente estos productos se purificaron por Wizard PCR Preps (Promega) y se digirieron con *AluI* durante 3h a 37°C. Los fragmentos generados se examinaron por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata.

Clonamiento y secuenciación de 16S rDNA. Los genes 16S rDNA amplificados por

PCR se clonaron en el vector TOPO TA (Invitrogene) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los plasmidos resultantes se purificaron por Wizard Plus SV Minipreps System (Promega) y aquellos conteniendo el tamaño de inserto esperado se visualizaron por electroforesis en agarosa. La selección de los diferentes clones se realizó mediante RFLP (tras amplificación) del 16S clonado y su comparación con los demás clones y con el DNA templado (homogenizado de ostra, filtro, fracción cultivable) para encontrar los 16S más prevalentes o de interés en las distintas muestras. En el caso de los genes de *V. parahaemolyticus* los distintos 16S rDNA se seleccionaron por la capacidad de generar heterodupletes entre sí. Los genes clonados se secuenciaron directamente del plasmidio con el secuenciador automático Applied Biosystem 310, empleando el kit de secuenciación ABI Prim y los partidores M13 y los partidores internos que se detallan a continuación: Eubac27F y 1492R (De Long 1992); 357F y 1100R (Johnson 1994), 946F (5-CCCGCACAAAGCGGTGGA-3') y 518R (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3'). También se secuenciaron productos de PCR obtenidos directamente de la amplificación de homogenizado; se omitió el clonamiento porque el análisis de RFLP arrojaba que la composición de la muestra estaba dominada por un tipo particular de 16S rDNA. Las secuencias fueron inspeccionadas y ensambladas manualmente y las comparaciones se efectuaron en GeneBank empleando Blastn.

Secuencias Nucleotídicas. Las secuencias han sido depositadas en GeneBank. Los números de acceso para los distintos genes 16SrDNA en *V. parahaemolyticus* son: AF388386 (Vp23), AF388387 (Vp16), AF388388 (F44), AF388389 (Vp27). Las secuencias de clones obtenidos del filtro son: AY077646, AY077647, AY077645 para genes relacionados con *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Alteromonas* respectivamente. La secuencia AY069963 del clon relacionado con *Arcobacter* y AY069962 para el producto de PCR cercano a *Staphylococcus* en la fracción no cultivable de la ostra. La secuencia AF406315 relacionada con *Pseudoalteromonas* en el proceso de descomposición. La secuencia AF502595 relacionada con *Pseudoalteromonas* del 16S rDNA del aislado 27 del grupo B, fracción cultivable de las ostras.

RESULTADOS

1. Tamaño de la microflora bacteriana en ostras y el efecto de la depuración sobre carga bacteriana en ostras

1.1. Tamaño de la microflora

La cantidad de bacterias totales presentes en ostras chilenas se determinó en homogenizados por varios métodos. Los resultados obtenidos oscilaron dentro del mismo orden según el método aplicado. Por microscopía de epifluorescencia empleando la tinción Live/Dead (ver Mat. y Met.) se obtuvieron valores cercanos a 10^{10} bacterias por gramo de tejido blando (excluyendo las conchas), donde las bacterias muertas fueron siempre menores del 10%. Determinaciones utilizando otros fluoróforos que se unen a DNA como naranja de acridina (Figura 1) arrojaron valores similares. Las bacterias también se titularon en medio de cultivo líquido (caldo marino) en condiciones aeróbicas y microaerofílicas; en estos casos se observaron valores de 10^5 bacterias/g y 10^7 bacterias/g respectivamente.

Para comprobar que el bajo número de UFC comparado con los 10^{10} bacterias/g observado por microscopía en los homogenizado de ostras, no se debía a la inactivación de las bacterias durante la homogenización, se utilizó un indicador de inactivación. Se agregaron cantidades conocidas de *Vibrio alginolyticus* a porciones de ostras picadas, que posteriormente se homogenizaron y plaquearon en agar marino. La recuperación de los vibrios agregados fue superior al 90% lo que sugiere que la muerte de las bacterias durante la homogenización fue muy baja.

Para estimar la cantidad de bacterias independiente de cultivo y por gramo de tejido, se utilizó la amplificación por PCR empleando partidores descritos como universales para bacterias (ver Mat. y Met.). En estas experiencias se agregaron cantidades conocidas de bacterias al homogenizado, antes de la extracción del DNA. Posteriormente, se determinó la última dilución amplificable y se comparó con el homogenizado sin bacterias agregadas. Los valores obtenidos en estas experiencias fueron cercanos a 10^9 bacterias/g.

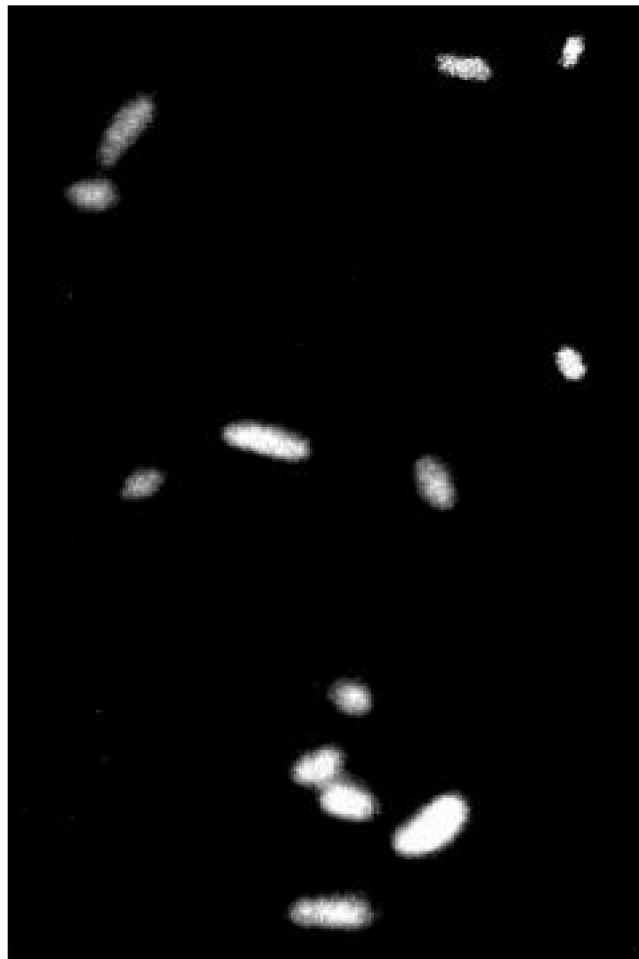


Figura 1. Muestra de homogenizado de ostra diluido 1/1000 y teñido con naranja de acridina observada por microscopía de epifluorescencia. Las bacterias teñidas pueden observarse como esferas blancas sobre el fondo negro.

1.2. Microflora remanente luego de la depuración

1.2.1. Depuración y velocidad de liberación de las bacterias desde las ostras

La depuración es un método ampliamente aplicado a nivel industrial para reducir el número de coliformes en bivalvos. En este estudio se implementó un pequeño sistema de laboratorio que consistió en un frasco conteniendo 300 ml de agua de mar y una única ostra sumergida. Para eliminar las bacterias el agua de este contenedor se recirculó y filtró continuamente (en filtros de hasta 0,2 mm). El sistema se modeló en forma simple. Considerando que el agua retornada al contenedor con la ostra, ya no contenía bacterias, la concentración de bacterias en el depurador (C) cambiaría de acuerdo con la velocidad de liberación de las bacterias desde la ostra y con la velocidad de eliminación en el filtro, siguiendo la ecuación:

$$dC/dt = -D \cdot C + G/V,$$

donde D es la velocidad de dilución (F/V), F es flujo y V el volumen de agua en el contenedor, y G es la velocidad de liberación de bacterias desde la ostra. La Figura 2 muestra los cambios en la concentración de bacterias en el agua, mientras ocurre la depuración en una experiencia representativa de ocho experimentos. La concentración en el agua se determinó por microscopía de epifluorescencia (bacterias totales) y por recuento en agar marino (UFC). Siguiendo un descenso inicial, la concentración de bacterias en el depurador se estabilizó entre 10^3 - 10^4 CFU por mL, la cual se mantuvo al menos por 20 h. De acuerdo a la ecuación anterior, este comportamiento indicaba que se había alcanzado un equilibrio entre la velocidad de liberación de bacterias desde la ostra y la velocidad de eliminación por filtración. Siendo $dC/dt=0$, las bacterias liberadas desde la ostra pueden calcularse de la siguiente ecuación:

$$G = D \cdot C \cdot V.$$

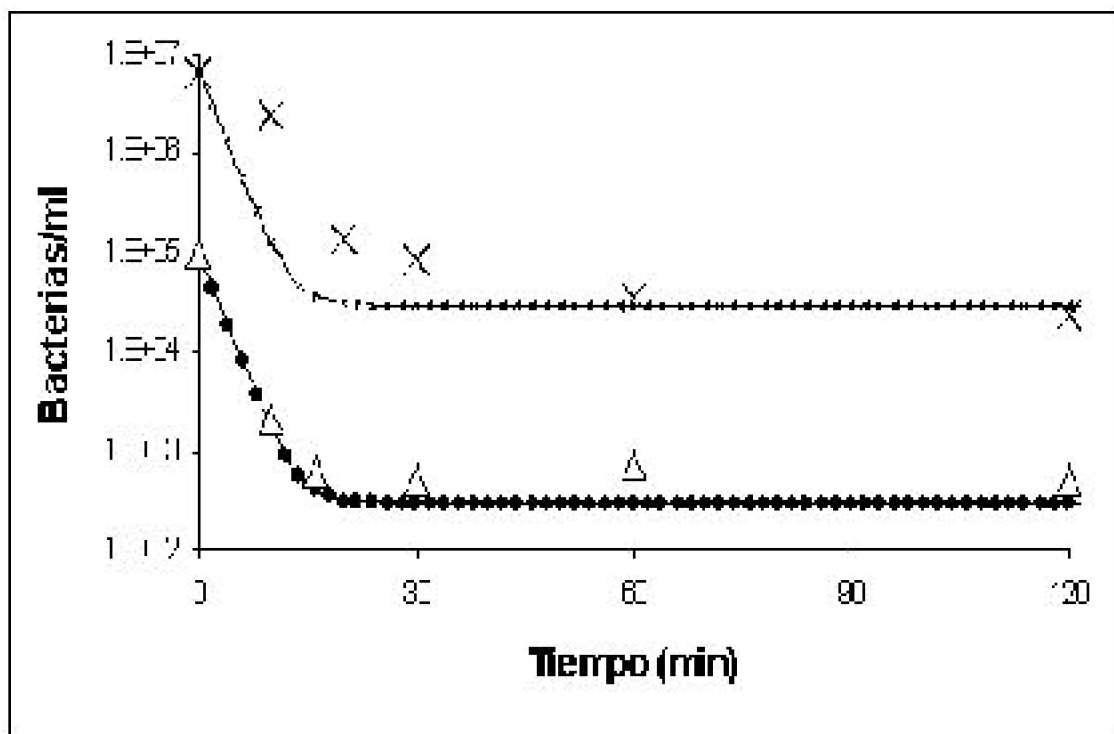


Figura 2. Concentración de bacterias en el contenedor durante la depuración. La concentración de bacterias se determinó a varios tiempos mediante recuento en agar marino (Δ) y por microscopía de epifluorescencia (X). Las líneas continuas corresponden a los valores esperados para la concentración de bacterias en el depurador, de acuerdo, a la velocidad de filtración fijada y a la velocidad de liberación de bacterias, calculada considerando el valor a equilibrio, observado después de los 20 min, con ambas mediciones, microscopía de epifluorescencia (-) y UFC en agar marino (·).

Valores de G entre 10^5 - 10^6 bacteria por minuto por ostra se calcularon desde los números observados por microscopía de epifluorescencia. En vista que se ha observado por microscopía un total de 10^{11} bacteria por ostra, puede inferirse que una prolongación de la depuración más allá de alcanzado el equilibrio, no cambiaría significativamente el contenido total de bacterias en la ostra. Tomando en cuenta que salen 10^5 a 10^6 bacterias por minuto, para disminuir la carga bacteriana en un 10%, se requerirán 10^4 min. Por otra parte, si se consideran los valores de UFC, la velocidad de liberación de bacterias desde la ostra se estimó en 10^4 UFC por min por ostra y considerando que existen cerca de 10^7 UFC por ostra, a esta velocidad se esperaría que dentro de 15 a 20 h de depuración, el contenido de bacterias en la ostras (medidas como UFC) alcanzaran valores cercanos a 0. Esto sólo si la cantidad de UFC no aumenta en la ostra durante ese lapso.

1.2.2. Fracción de bacterias liberadas y no liberadas por la depuración.

Considerando los resultados anteriores, se emplearon ostras depuradas por 2 horas para analizar su carga bacteriana. Se supone que en estas ostras la carga de bacterias alóctonas es mínima. Después de la depuración se determinó el número de bacterias liberadas y remanentes en las ostras. Las bacterias liberadas se determinaron contando

aquellas retenidas en el filtro de 0,2 mm y las bacterias remanentes contado aquellas en el homogenizado de la ostra depurada. La Tabla 1 muestra los valores de UFC en agar marino y de bacterias totales por microscopía de epifluorescencia . Los valores observados muestran que una fracción importante de las bacterias liberadas (retenidas por el filtro) fueron capaces de formar colonias en agar marino. Esta fracción osciló entre el 30 al 50% de las UFC observadas en el homogenizado de la ostra depurada. Sin embargo, sólo una fracción mucho menor (0.5-0.05%) de las bacterias observadas por microscopía en el homogenizado de la ostra depurada, fue capaz de formar colonias en las mismas condiciones, indicando que la fracción liberada es pequeña. En otras palabras, sólo se liberó el 0.5% de las bacterias totales, pero un 30-50% de las bacterias formadoras de colonias. Los vibrios (UFC en TCBS) parecen ser excretados en menor proporción que los UFC en agar marino.

Tabla 1. Bacterias liberadas (recuperadas en filtro 0,2 mm) y remanentes en la ostra después de la depuración.

Método de recuento	Homogenizado Ostra Depurada	Filtro 0,2 mm	Recuperación en filtro (% del total)
UFC en agar marino	$6.1 \cdot 10^7$	$3.5 \cdot 10^7$	36.2
Microscopía de Epifluorescencia	$1.0 \cdot 10^{11}$	$5.2 \cdot 10^8$	0.5

1.2.3. Bacterias remanentes en las ostras y excretadas después de la depuración

Para explorar la selectividad de la depuración sobre las especies bacterianas, la composición de la fracción retenida en el filtro se comparó con la remanente en la ostra, a través del análisis del patrón de espaciadores ribosomales 16S-23S rDNA obtenidos por amplificación por PCR. Se analizó la población total, es decir, a partir del DNA extraído directamente de la ostra y del filtro; y la población presente en la fracción cultivable, es decir, desde el DNA obtenido de las colonias crecidas en agar marino. Los patrones observados entre la población total retenida y la total liberada fueron muy diferentes (Figura 3 carriles O y F). El número de bandas observadas en la población liberada es notablemente menor que en la población retenida en la ostra, sugiriendo que algunas bacterias fueron liberadas selectivamente. Cuando se comparan las poblaciones de las bacterias cultivables, se observan patrones similares (carriles Oc y Fc). Al comparar los patrones de las bacterias totales se observan patrones muy diferentes, con la intensidad de algunas bandas muy aumentada, sugiriendo una selección en las bacterias excretadas (carriles O y F). Algunos espaciadores importantes en el homogenizado no se observaron en el filtro y probablemente las bacterias que los portaban no se liberaron o excretaron. En el filtro, la comparación entre las bacterias totales (F) y las cultivables (Fc) indicó que la mayoría de las bacterias liberadas son cultivables, contrariamente a lo observado con las remanentes (carriles O y Oc). Sin embargo, algunas de las bacterias excretadas con espaciadores cercanos a 900 pb, fueron capaces de crecer en agar marino

1.2.4. Bacterias liberadas durante la depuración.

El grupo de las bacterias liberadas en mayor proporción durante la depuración se determinó por análisis del 16S rDNA de los microorganismos retenidos en el filtro. En esta aproximación, se considera que los fragmentos generados en mayor abundancia provienen de las bacterias más abundantes en esa mezcla. Siguiendo esta estrategia el DNA de las bacterias retenidas en el filtro se extrajo, se amplificó por PCR y se digirió para identificar los principales fragmentos de restricción. Los 16S rDNA amplificados se clonaron para separar las moléculas individuales y subsecuentemente identificar aquellas que originaron los principales fragmentos de restricción.

fig003.jpg

La Figura 4 muestra el patrón de RFLP de los 16S rDNA amplificados del DNA extraído del filtro y de los clones seleccionados. Estos clones C2, C7 y C15 se secuenciaron y mostraron un alto grado de identidad, de 98, 97 y 99%, con los géneros *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Alteromonas*, respectivamente. Estos resultados sugieren que las bacterias liberadas por la depuración corresponden mayoritariamente a estos géneros.

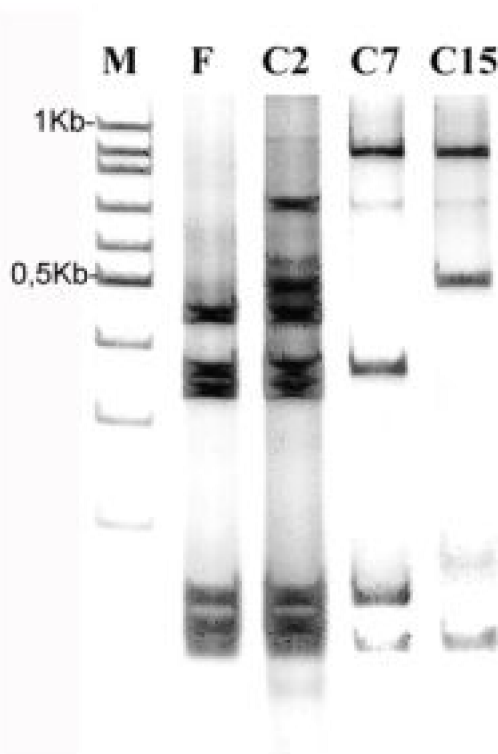


Figura 4. RFLP con *HaeIII* de los amplificados de 16S rDNA de bacterias liberadas por la depuración. El carril F corresponde al patrón generado por los productos de PCR obtenidos del DNA del filtro de 0,2 mm. Los carriles C2, C7 y C15 corresponden al patrón de los clones de alguno de los 16S rDNA amplificados.

2. Composición de la microflora de la ostra chilena

2.1. Bacterias cultivables en ostras chilenas

La composición de la microflora bacteriana de las ostras se analizó en la fracción de bacterias capaces de crecer en agar marino. Esta fracción siempre representó menos del 0,1% del total de bacterias observadas por microscopía de epifluorescencia. Los homogenizados se plaquearon sobre agar marino, observándose entre 10^3 y 10^5 UFC/g. Para determinar la presencia de posibles vibrios, los homogenizados también se plaquearon sobre TCBS a 37°C, pero ninguna colonia fue observada a esta temperatura, indicando que estos vibrios estarían por debajo de 25 UFC/g.

La diversidad genética entre las colonias obtenidas en agar marino, se ensayó a través de la comparación de su patrón de espaciadores ribosomales, 16S-23S rDNA, visualizados en geles de poliacrilamida, después de amplificar por PCR. Se emplearon colonias individuales como templados para la amplificación por PCR con primarios específicos para la región espaciadora (16S-23S rDNA). El 80% de las colonias obtenidas en una muestra (Calbuco, octubre 1999) pudieron agruparse en tres patrones, denominados A, B y C, (Figura 5). Las cepas del grupo A mostraron dos bandas características de 500 y 850 pares de bases. El grupo B se caracterizó por una banda intensa de 400 pb mientras el grupo C presentó bandas de 450 y 470 pb. Sin embargo, el grado de similitud del patrón y el número total de bandas fue variable en cada grupo.

Para establecer la coherencia de los grupos definidos por espaciadores se compararon los 16S rDNA mediante el ensayo de movilidad del heteroduplete. Los 16S rDNA se amplificaron a partir de una única colonia (de la misma forma que los espaciadores) y se combinaron en cantidades iguales para el ensayo de heterodupletes. Las cepas de los grupos A y B mostraron heterodupletes con respecto a las cepas de su mismo grupo, un retardo muy débil en la migración respecto a los homodupletes (Figura 6 A, carriles A1/A2 y B1/B2), indicando que la secuencia de los 16S rDNA entre las bacterias de su mismo grupo es muy similar o casi idéntica.

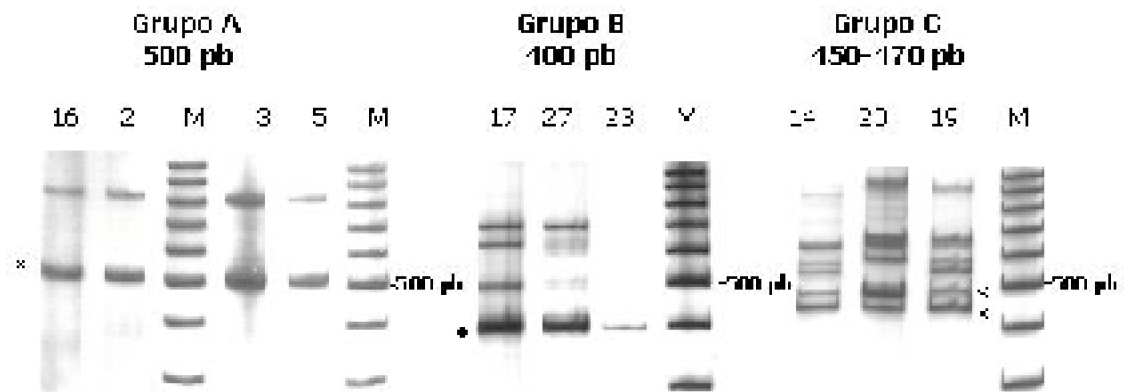


Figura 5. Patrón de espaciadores obtenido por amplificación a partir de colonias aisladas desde ostras. Los aislados se agruparon de acuerdo a su patrón de espaciadores; el número sobre cada carril identifica al aislado; (X) indica el espaciador principal de 500 pb observado en el Grupo A, (·) señala el espaciador principal de 400 pb en el Grupo B y (*) señala el duplete de espaciadores de 450/470 pb en el Grupo C. M es el marcador de peso molecular (Gibco).

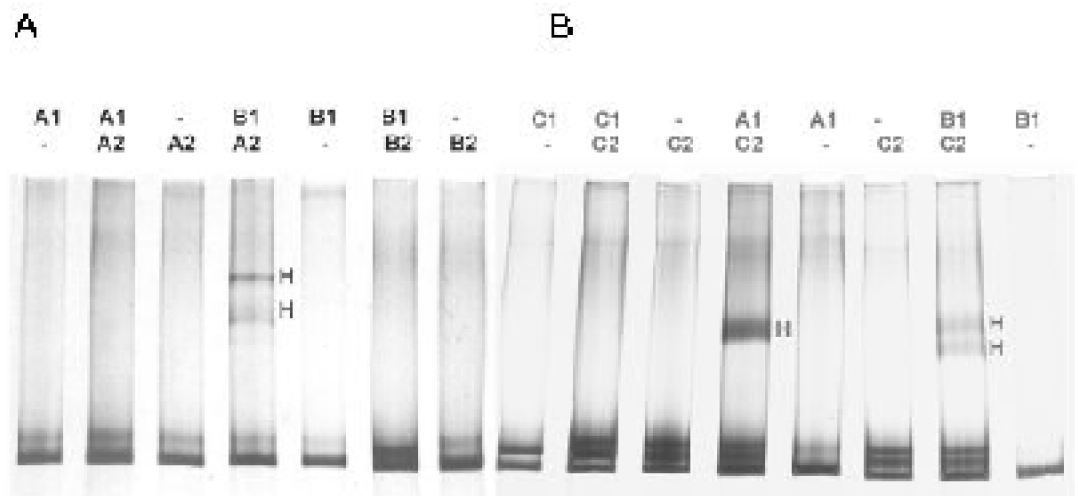


Figura 6. Homología de secuencia del gen 16S rDNA entre aislados de los Grupos A, B y C, estimada por HMA. Las letras en el borde superior indican el Grupo (de acuerdo al patrón de espaciadores) al que pertenece la colonia en la mezcla de renaturación. El número señala al aislado amplificado. (-) indica la ausencia de un segundo 16S rDNA. (H) señala los heterodupletes.

Por otra parte, la hibridación entre cepas de los grupos A y B resultó en la formación de heterodupletes con un retardo significativo (Figura 6 A, carril B1/A2). De acuerdo a resultados previos (Espejo y cols., 1998) este retardo corresponde aproximadamente a un 15% de diferencia en la secuencia.

Las bacterias del grupo C mostraron una característica especial. La amplificación del

16S rDNA de las cepas del grupo C rindió productos con migración diferente a la del amplificado (Fig. 6 B, carriles C1/- and -/C2). La naturaleza de heterodupletes de estos productos se demostró por su desaparición después de diluirlos y someterlos a un ciclo extra de amplificación. La observación de 16S rDNA con secuencias diferentes cuando se amplifica una colonia es resultado del polimorfismo de este gen en las distintas copias de operones ribosomales (Ver Resultados Sección 4). Por otra parte, la movilidad de los heterodupletes formados al hibridar cepas del grupo C reveló diferencias en las secuencias de los 16S rDNA similares a las observadas en las cepas individuales (Fig. 6 B, carril C1/C2), indicando que las diferencias entre cepas es similar a la observada intracepa o en la misma cepa, es decir, cercana al 2%. En cambio, los heterodupletes formados entre cepas del grupo C y cepas de A o B mostraron una migración lenta compatible con una diferencia en secuencia cercana al 15% (Fig. 6 carriles A1/C2, B1/C2).

Finalmente, la secuenciación parcial del 16S rDNA de una cepa del grupo B y su posterior comparación en los bancos de datos indicó que las bacterias más relacionadas pertenecen al género *Pseudoalteromonas* con una identidad del 98% (N° acceso AF502595). A través del ensayo de heterodupletes, los componentes del grupo C se compararon con cepas tipo del género *Vibrio* mostrando diferencias menores al 4%, por lo que se consideraron pertenecientes a este género (Ver Resultados Sección 4). La caracterización fenotípica de estos grupos indicó que sólo los aislados del grupo C eran capaces de crecer en TCBS (17°C) un medio sólido considerado selectivo para *Vibrio*.

2.2. Bacterias no cultivables en ostras chilenas

2.2.1. Comparación de la fracción cultivable y la comunidad total en las ostras

Las bacterias cultivables caracterizadas en la sección anterior corresponden a una pequeña fracción del total presente en las ostras. Para ver la correspondencia de las bacterias cultivables con las totales se compararon ambas poblaciones. La composición de la población se comparó por análisis del patrón de los espaciadores 16S-23S rDNA, observados después de amplificación por PCR. Los patrones obtenidos fueron muy diferentes, sugiriendo que la población cultivada en agar marino fue muy distinta a la población total (Fig. 7). Las principales bandas observadas en el producto de amplificación obtenido directamente de las ostras no se observan en la fracción cultivable en agar marino.

2.2.2. Espaciador 16-23S rDNA más común y abundante

La composición de las comunidades bacterianas presentes en ostras chilenas fue analizada visualizando las regiones espaciadores 16S-23S rDNA en la forma descrita anteriormente. Este análisis se realizó mediante amplificación del DNA extraído directamente del homogenizado de ostras, sin cultivo previo. Las ostras fueron procesadas individualmente o en grupos de tres.

Bajo la premisa que las poblaciones bacterianas comunes en los hospederos (ostras) corresponden a componentes de la microflora normal, el patrón de espaciadores de seis ostras no depuradas procesadas separadamente fue comparado en un gel de poliacrilamida. A pesar que diferentes individuos tuvieron diferentes patrones de espaciadores, se pudo distinguir algunos espaciadores de igual migración en la mayoría de las ostras. Tres espaciadores específicos fueron observados al menos en 4 de los 6 individuos analizados, aunque en diferentes proporciones (Fig. 8.A); sus tamaños aproximados fueron 1.000, 550, y 450 bp.

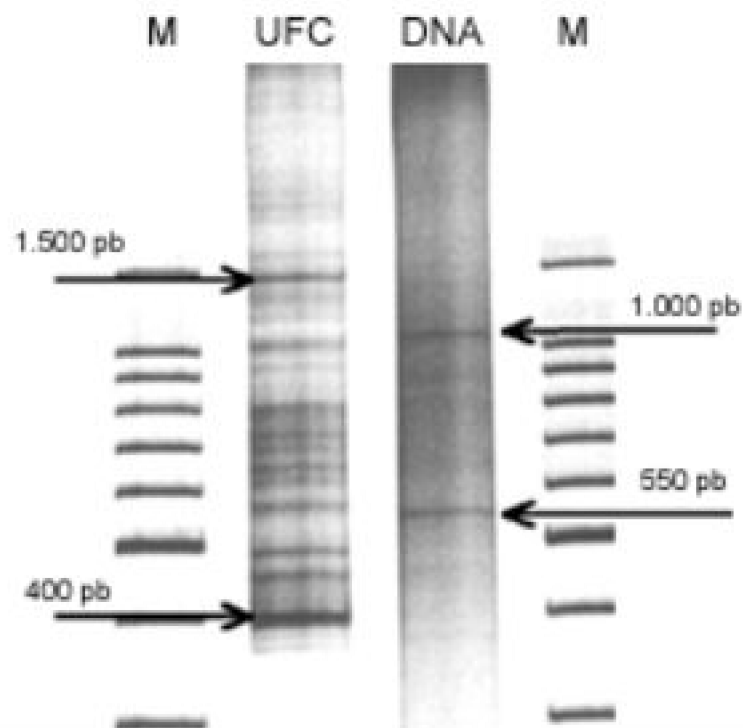


Figura 7. Patrón de espaciadores 16S-23S rDNA observado luego de amplificación del DNA extraído de colonias crecidas en agar marino (fracción cultivable, carril UFC) y del DNA extraído directamente de un grupo de ostras homogenizadas (DNA). Las flechas señalan los principales espaciadores observados. M es el marcador de peso molecular 100 pb (Gibco).

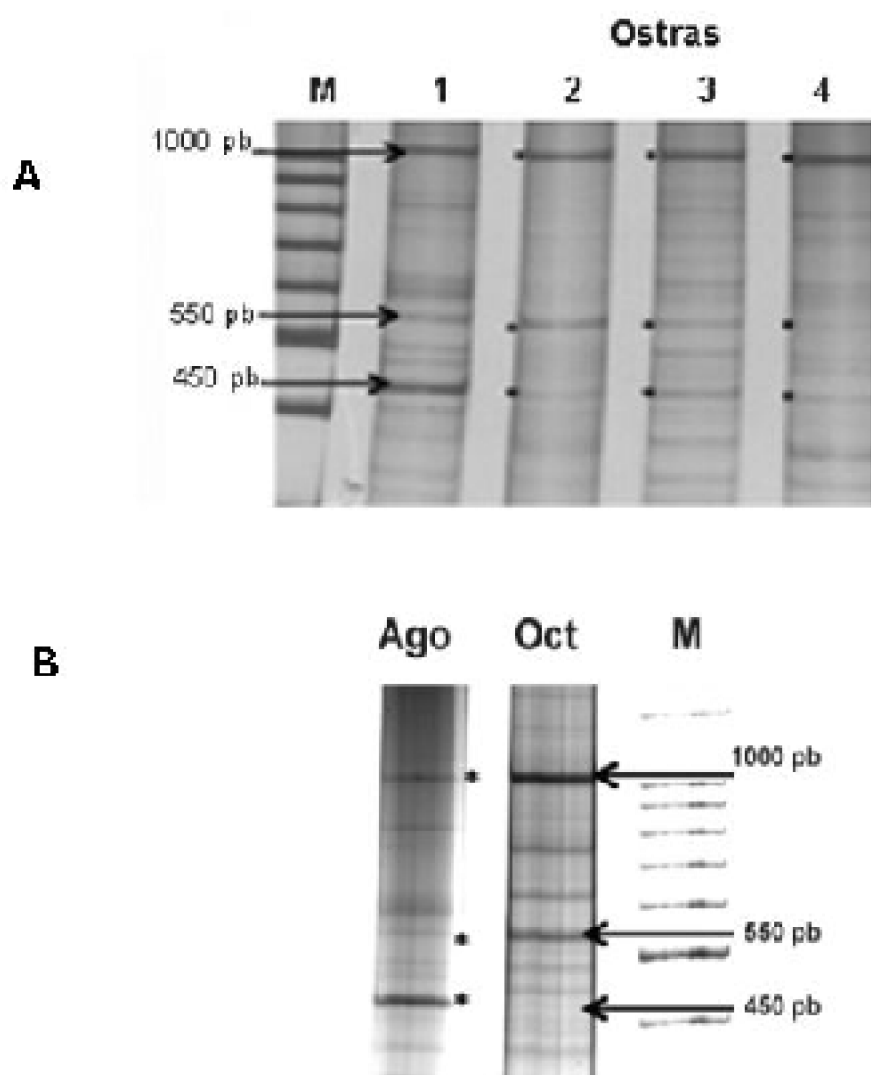


Figura 8. Espaciadores 16S-23S rDNA observados tras amplificación del DNA extraído de ostras individuales (A) y de grupos de seis ostras cosechadas en Calbuco en Agosto y Octubre de 1999 (B). Las flechas y asteriscos indican la posición y tamaño de los espaciadores más comúnmente observados.

El espaciador de 1.000 pb se observó como una banda intensa en la mayoría de las ostras, a pesar de provenir éstas de sitios muy distantes (Calbuco, Horcón) y de ser cosechadas en diferentes temporadas (1999, 2000 y 2001) e independientemente de si fueron depuradas o no (Fig. 8.B). No obstante, este producto no se observó tras la amplificación de DNA obtenido de las bacterias cultivadas. Los intentos por recuperar esta hipotética bacteria resultaron infructuosos, a pesar de ensayar distintas condiciones de cultivo aeróbicas, semi-anaerobias (Fig. 9) y anaerobias (no mostrado).

2.2.3. Relación entre el espaciador más abundante y el 16S rDNA prevalente

Para definir la especie o género bacteriano de la bacteria portadora del espaciador de

1.000 pb, se analizó su 16S rDNA contiguo. Para ello se realizó una amplificación que incluyera buena parte del 16S rDNA junto al espaciador. Se utilizó un partidor “forward” que hibrida cerca extremo 5’ del 16S rDNA (Eubac 27F) y un partidor reverso que se une al extremo 5’ del 23S (L1). Se empleó una ostra individual que presentaba ambos, el espaciador de 1.000 pb y el patrón de restricción más común (Figura 10 carril O5). El producto esperado tuvo un tamaño de 2,5 Kb, como se observó luego de electroforesis en agarosa. Este fragmento fue cortado, eluído del gel y usado como templado para la amplificación de espaciadores. Como se esperaba, se obtuvo un producto de 1.000 pb (no mostrado). Posteriormente, se comparó el patrón de restricción del 16S rDNA amplificado de este producto con el obtenido del DNA de la ostra. La Figura 11 muestra que estos productos generaban fragmentos de restricción muy diferentes, con *HaeIII* y *RsaI*, lo cual sugiere que el 16S rDNA observado como prevalente en ostras, no estaba contiguo al espaciador de 1.000 pb observado como común y abundante tras la amplificación de espaciadores. La secuenciación de 300 bp del 16S rDNA contiguo al espaciador de 1.000 pb, entre las posiciones 360 a 660, (numeración *E. coli*, Lane 1991) indicó por comparación con BlastN una identidad del 92% con bacterias del género *Staphylococcus* (N° acceso AY69962).

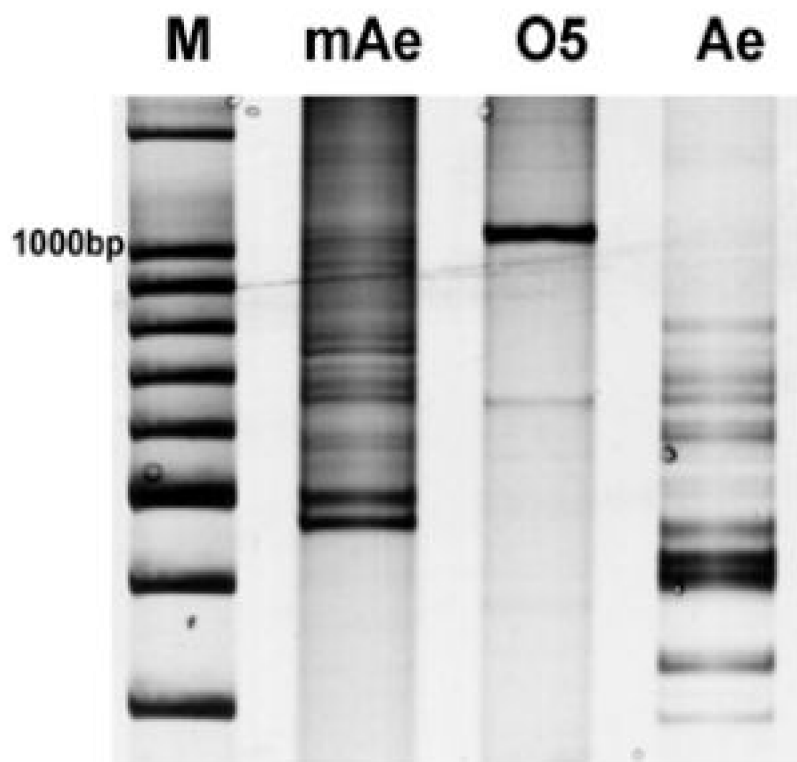


Figura 9. Patrón de espaciadores obtenido por amplificación de DNA extraído de homogenizado de una ostra única O5 (carril O5) y de colonias crecidas luego de cultivar este homogenizado en agar marino en distintas concentraciones de oxígeno; condición aeróbica (Ae) y microaerofílica (mAe). M corresponde a 100 bp marcador de peso molecular(Gibco).

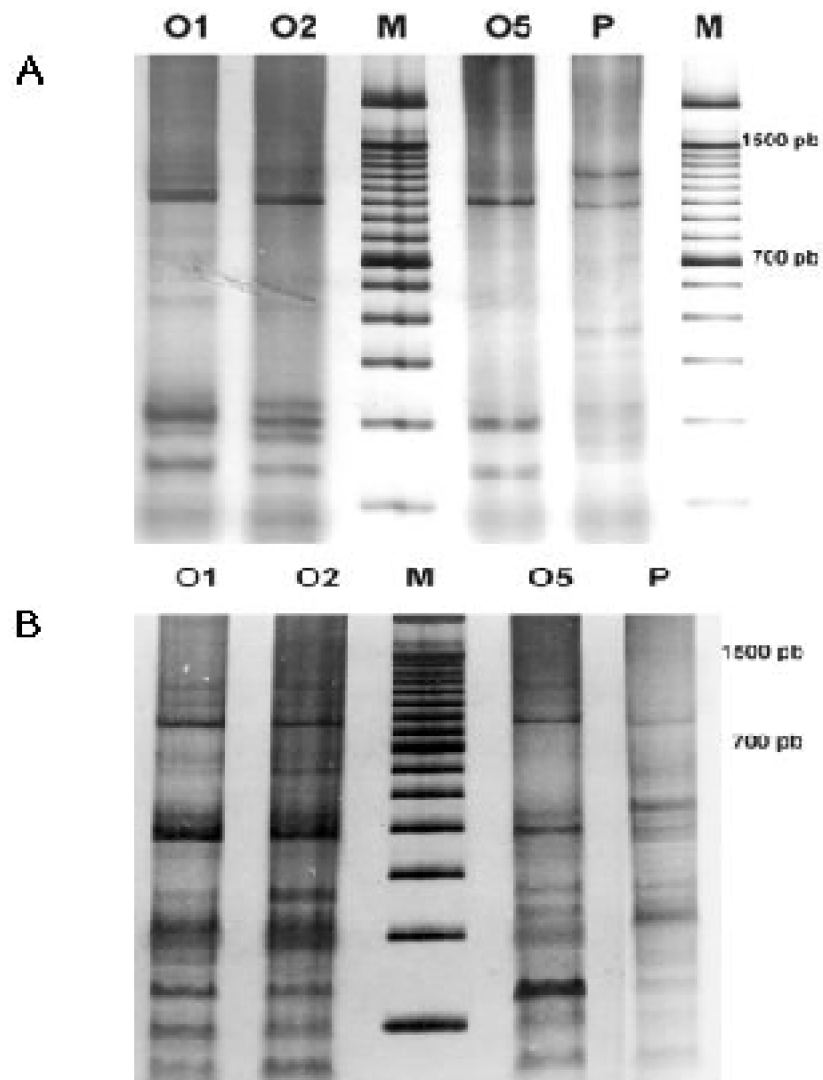


Figura 10. RFLP del gen 16S rDNA amplificado a partir de DNA extraído desde ostras individuales (carriles O1, O2, O5) y desde grupos conteniendo tres ostras cada uno (carril P). La digestión se realizó con HaeIII (A) y AluI (B). M corresponde al marcador de tamaño, 100 bp (Gibco). Las líneas indican los principales fragmentos observados.

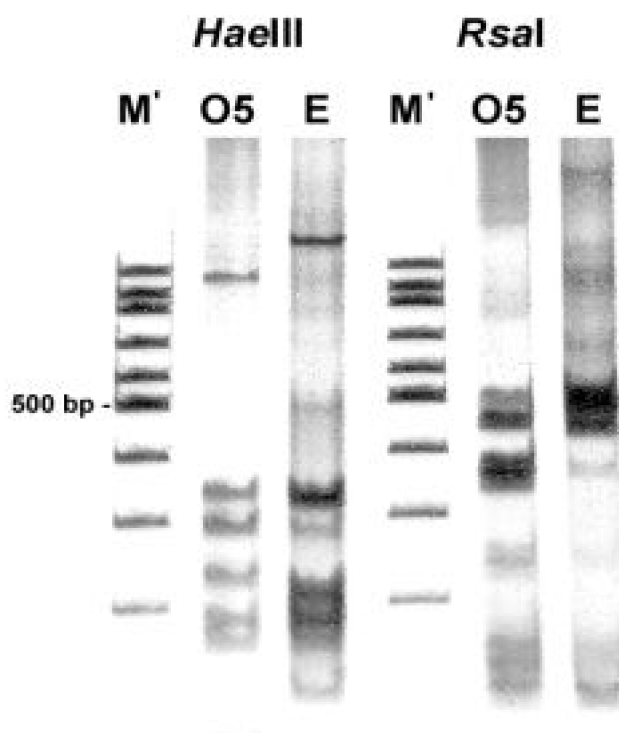


Figura 11. RFLP del amplificado de gen 16S rDNA adyacente al espaciador prevalente. Patrón de restricción del amplificado de gen 16S rDNA desde DNA extraído de ostra O5 (carril O5) y desde el producto de la amplificación del 16S rDNA junto al espaciador (carril E). Los tratamientos de restricción fueron ejecutados con *HaeIII* y *RsaI*. M' 100 bp marcador de tamaño (MBI Fermentas).

2.2.4. 16S rDNA prevalente

La mayor abundancia relativa del espaciador de 1.000 pb sugería que correspondía a una bacteria abundante y frecuente, abundancia que se reflejaría en los genes ribosomales. De esta forma, se estudió la composición de la microflora, por medio del patrón de restricción del gen 16S rDNA amplificado a partir de extractos de ostras depuradas. En esta ocasión se emplearon partidores para bacterias desde la posición 27 a la 1492. La comparación de los patrones después de tratar con *AluI* y *HaeIII* permitió detectar la presencia de fragmentos de restricción comunes en la mayoría de las ostras analizadas, que además eran abundantes dentro de cada patrón (Fig. 10). Dada la notable abundancia relativa de estas bandas fue fácil obtener clones de genes 16S rDNA con el patrón de restricción conteniendo las bandas comunes. Se obtuvieron cinco clones de los cuales dos (clones 15 y 12) produjeron un patrón de restricción idéntico a los observados en los extractos de la ostra de la cual se obtuvo el DNA (Fig. 12). La secuenciación de 1425 pb del clon 15 (Nº acceso AY069963) y su comparación en GeneBank con BlastN indicó que las secuencias de 16S más cercanas con un 96% de identidad, corresponde a bacterias del género *Arcobacter*. La secuencia de 350 pb del clon 12 también resultó relacionada con este género bacteriano.

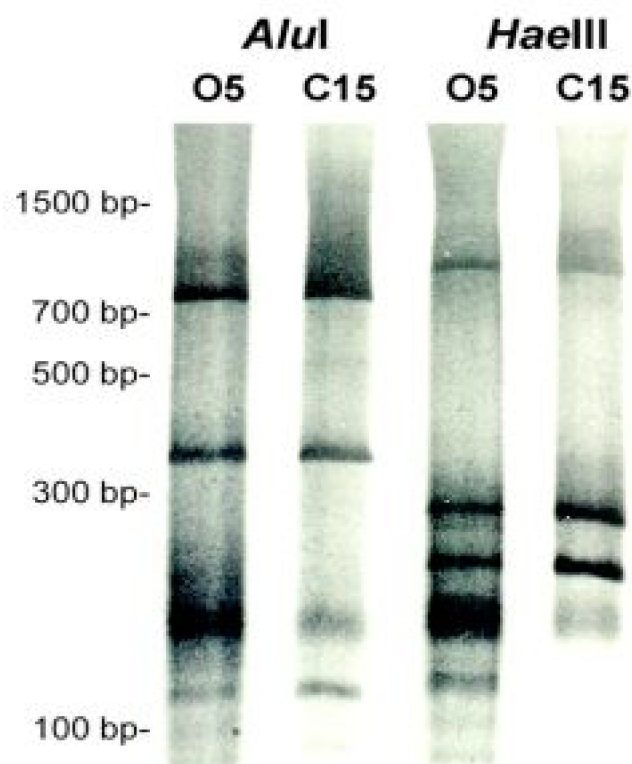


Figura 12. RFLP de los 16S rDNA amplificados desde DNA de la ostra O5 (carril O5) y del clon 15 de 16S rDNA (carril C15).

3. Participación de la microflora en el proceso de descomposición en ostras chilenas.

3.1. Evolución de la carga bacteriana durante guarda

El número de bacterias totales medido por microscopía de epifluorescencia y el de bacterias cultivables medido como unidades formadoras de colonias fue seguido en las ostras desde la cosecha y hasta 100 h de almacenamiento. Al final de este período fue posible apreciar un claro deterioro de las ostras en sus propiedades organolépticas, aparición de un olor putrefacto y apariencia mucilaginosa. Durante la guarda a 18°C, las UFC presentan una clara tendencia al aumento y tras 100 h de guarda, las ostras alcanzaron una carga bacteriana 50 veces mayor a la que se registró en las ostras recién cosechadas. Sin embargo, este aumento en la fracción cultivable no fue acompañado de cambios similares en el recuento total por microscopía de epifluorescencia usando la

tinción del kit Live/Dead. El recuento total cercano a 10^{10} bacterias/g prácticamente sólo aumentó levemente al inicio (Fig. 13).

Como se mencionó anteriormente (sección Bacterias no cultivables) en ostras frescas la fracción cultivable corresponde al 0,01% del total de las bacterias viables putativas observadas en los homogenizados. Luego de 25 h de guarda la fracción cultivable alcanzó el 0,1% y las ostras retuvieron sus propiedades organolépticas. Sin embargo, a las 100 h la fracción cultivable llegó al 1% y en este punto las ostras se encontraron en descomposición, con un aspecto mucilaginoso del tejido y despidiendo mal olor. Un comportamiento similar se observó en un experimento paralelo realizado con ostras no depuradas (no mostrado). La presencia de posibles vibrios patógenos fue seguida con la siembra de homogenizado sobre placas de TCBS incubadas a 37°C . Éstos sólo fueron detectables a las 100 h de guarda cuando alcanzaron niveles de 10^4 UFC/g.

3.2. Cambios en la composición de la comunidad bacteriana durante guarda

El cambio en la composición de la comunidad bacteriana presente en las ostras durante la guarda y la descomposición se analizó determinando el patrón de espaciadores ribosomales, obtenidos tras amplificar el DNA extraído de homogenizados (grupos de tres ostras). El cambio

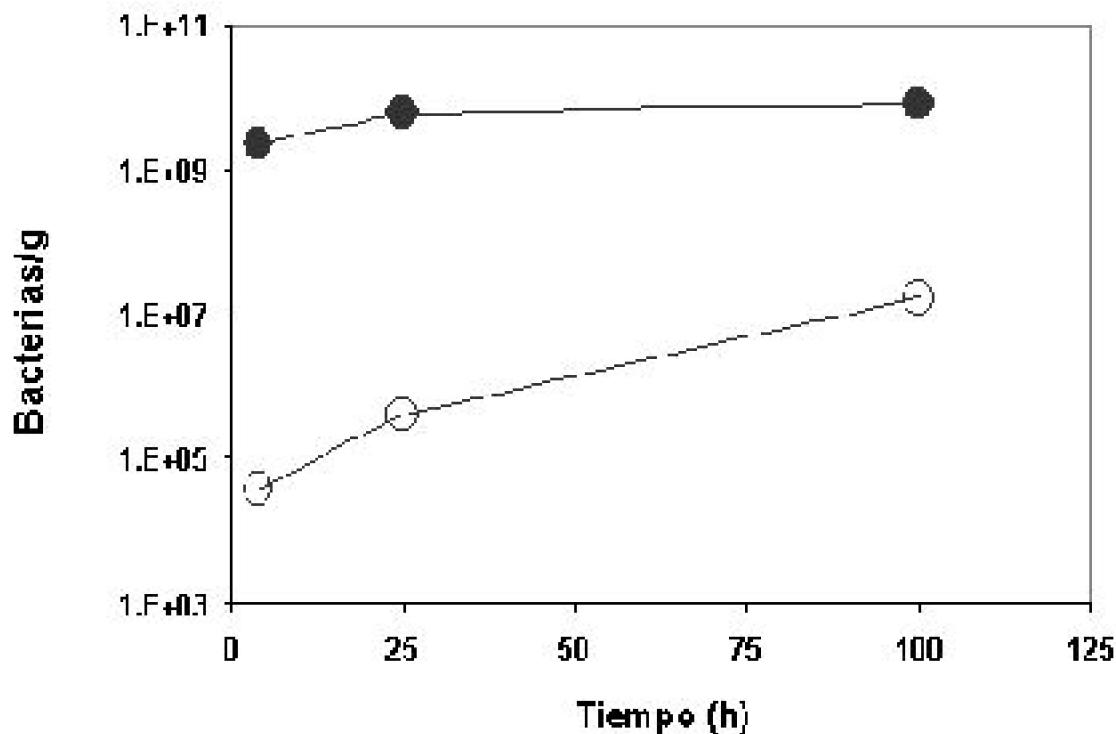


Figura 13. Carga bacteriana en ostras almacenadas a 18°C luego de ser cosechadas. Las

"bacterias totales vivas" se determinaron por microscopía de epifluorescencia con tinción LIVE/DEAD BacLight de Molecular Probes (·); las bacterias cultivables se determinaron como UFC en agar marino (o).

en la fracción cultivable fue analizada de la misma forma con DNA extraído desde placas de agar marino que contenían 200 colonias. En la Figura 14.A. se muestran los patrones obtenidos en los diferentes tiempos de guarda, para los extractos de DNA de homogenizados, es decir, las bacterias totales. Esta figura muestra que los patrones son semejantes entre un pool y otro, en cada uno de los tiempos analizados (4, 25 y 100 h). El resultado más notorio fue la abundancia de un espaciador de 400 pb en los tres pooles procesados a las 100 h, que no fue detectado en las ostras frescas. La fracción cultivada, en cambio, presentó una banda de 400 pb en todos los tiempos analizados. Sin embargo, la intensidad de esta banda parece ir en aumento conforme transcurre la guarda y es muy intensa en ostras a las 100h de guarda (Fig. 14.B). La experiencia paralela con ostras no depuradas arrojó resultados similares en los patrones de espaciadores, tanto el total como la fracción cultivable (no mostrado). Una sorpresa resultó el hecho que estas ostras cosechadas en octubre del 2000 en Horcón, rindieran resultados muy similares a los obtenidos con ostras cosechadas en agosto de 1999 en Calbuco y sometidas a las mismas condiciones de guarda (Fig. 15).

3.3. Identificación y caracterización de la bacteria abundante en ostras descompuestas.

Para identificar la o las bacterias portadoras del espaciador de 400 pb observado en abundancia, se realizó una revisión de las colonias crecidas en las placas de agar marino provenientes de homogenizados de ostras descompuestas. El DNA obtenido de colonias individualmente se usó como templado para amplificar los espaciadores. Más del 70% de las colonias presentaban el espaciador de 400 pb en sus patrones, sin embargo, los patrones no eran idénticos. Se escogió el aislado 400bp31 porque presentaba una banda intensa del espaciador de 400 pb. Sin embargo, para comprobar que este espaciador realmente correspondía a aquel observado en abundancia en ostras descompuestas, se compararon los patrones de restricción de ambos. Para ello se purificaron las bandas de 400 pb desde geles de agarosa y se sometieron a la acción de *A/ul*. El espaciador del aislado 400bp31 produjo los

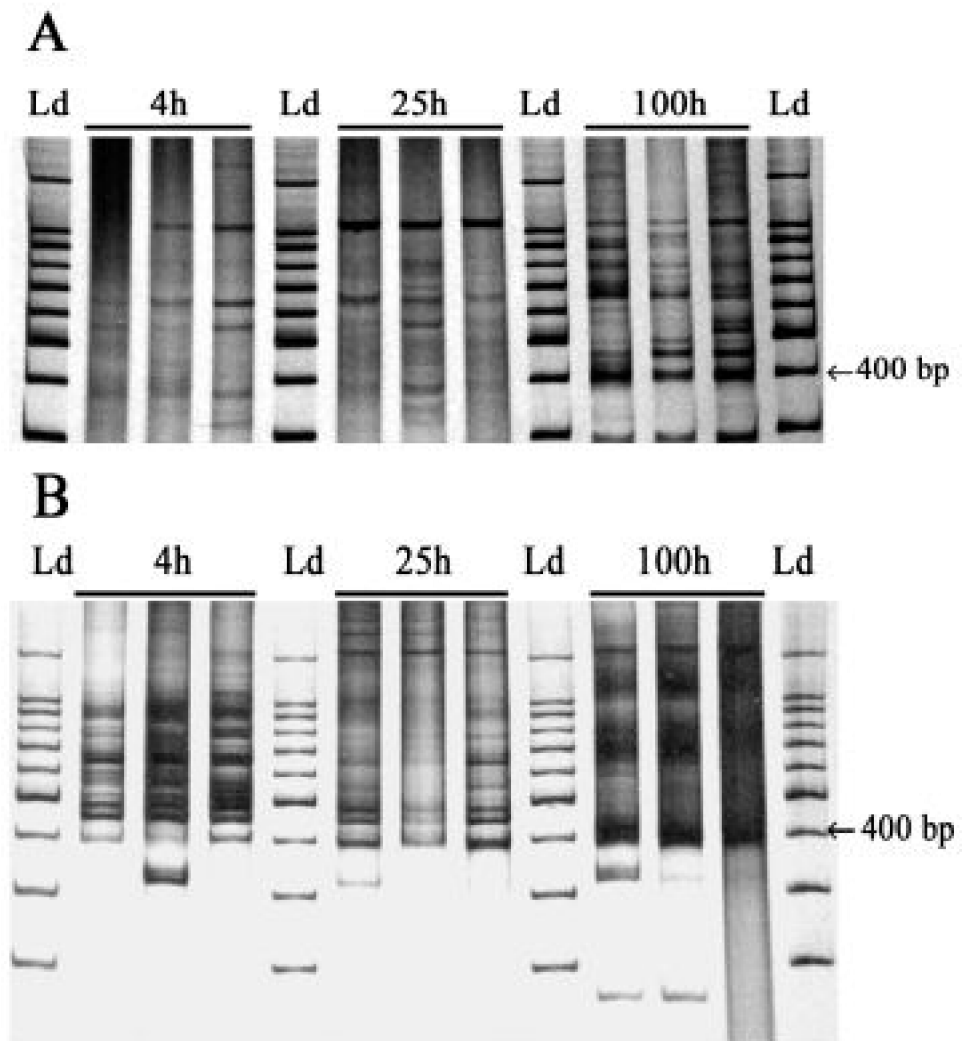


Figura 14. Patrón de espaciadores 16S-23S rDNA obtenidos tras amplificación del DNA obtenido de homogenizados de "pooles" de tres ostras depuradas (bacterias totales, A) y desde DNA de colonias crecidas en agar marino, sembrado con esos homogenizados (B). Las leyendas subrayadas indican las horas de almacenamiento a 18 °C. Ld, 100 bp marcador peso molecular. Ostras obtenidas en Horcón, Octubre 2000.

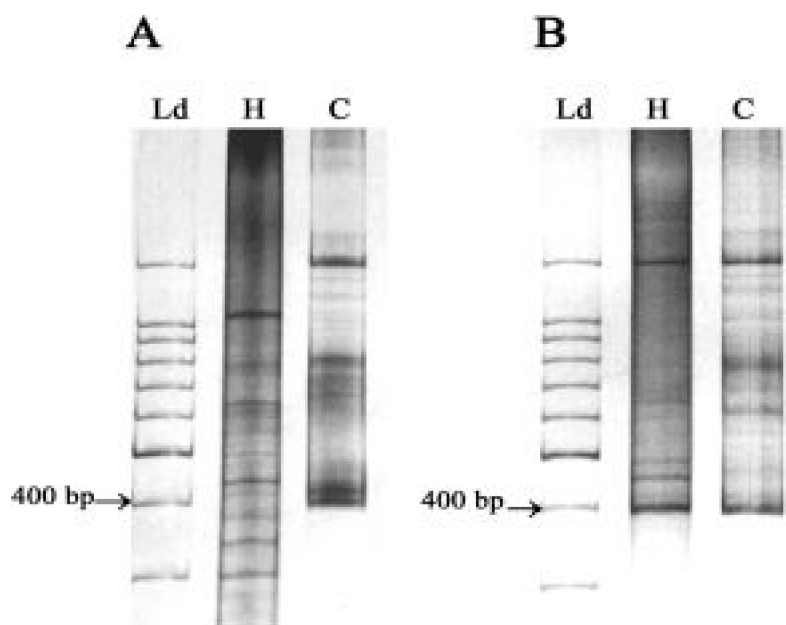


Figura 15. Patrón de espaciadores ribosomales obtenidos por amplificación de DNA de homogenizados de ostras depuradas (carriles H) y de la fracción cultivable de estos homogenizados en agar marino (carriles C). A y B, son análisis a las 4 y 100 h después de la cosecha. Ld: 100 bp marcador de peso. Ostras obtenidas en Calbuco, Septiembre 1999.

mismos fragmentos de restricción que los generados por los espaciadores provenientes de los homogenizados y la fracción cultivable (Fig. 16). Para señalar a esta cepa como una de las más abundantes en las ostras descompuestas se realizaron ensayos de restricción sobre el 16S rDNA amplificado a partir del aislado, del DNA homogenizado, y de la fracción cultivable. La comparación de los patrones mostró que los fragmentos de restricción del aislado se corresponden con las principales bandas en el patrón de las fracciones cultivables y en los perfiles de restricción de los homogenizados (Fig. 17).

Para definir la posición taxonómica del aislado 400bp31, se determinó la secuencia de su 16S rDNA (742 nucleótidos, N° acceso AF406315). La comparación de esta secuencia con las secuencias disponibles según Blastn mostró que las bacterias más relacionadas a este aislado, corresponden al género *Pseudoalteromonas* con un 98% de identidad. La caracterización fenotípica de esta cepa mostró que esta bacteria es un bacilo gram negativo, no luminiscente, móvil, cuyas dimensiones son 3x1 micras y posee un largo flagelo polar. Además, tiene un tiempo de generación de 4 h en caldo marino a 17 °C. No crece a 37 °C, ni a concentraciones de sal más bajas de 0,1 veces la salinidad del agua de mar. Es oxidasa positivo; produce exoenzimas como proteasa y b-glucosidasa; es capaz de asimilar glucosa, N-acetil-glicosamina, maltosa y malato; y fermenta lentamente fructosa, pero no glucosa.

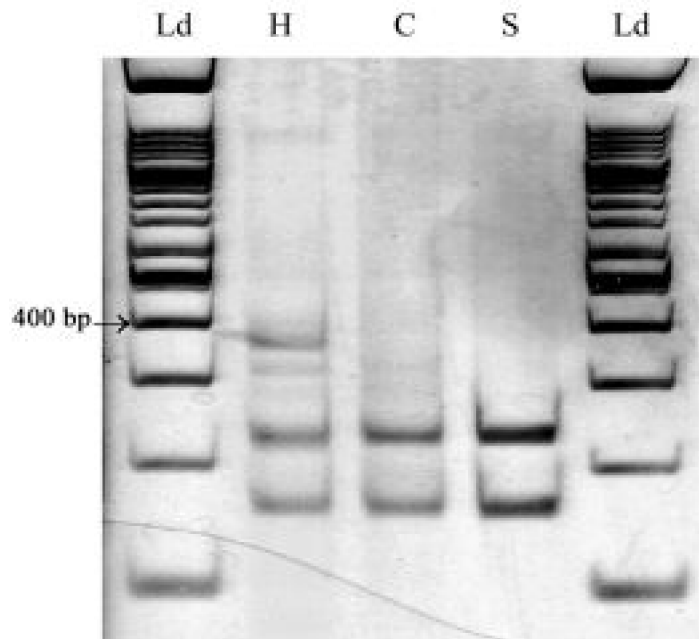


Figura 16. Fragmentos de restricción con *AluI* de espaciadores de 400 pb obtenidos de amplificados: de ostras descompuestas (H), fracción cultivable en agar marino (C) y aislado 400bp31 (S). Ld: 100 bp marcador peso molecular.

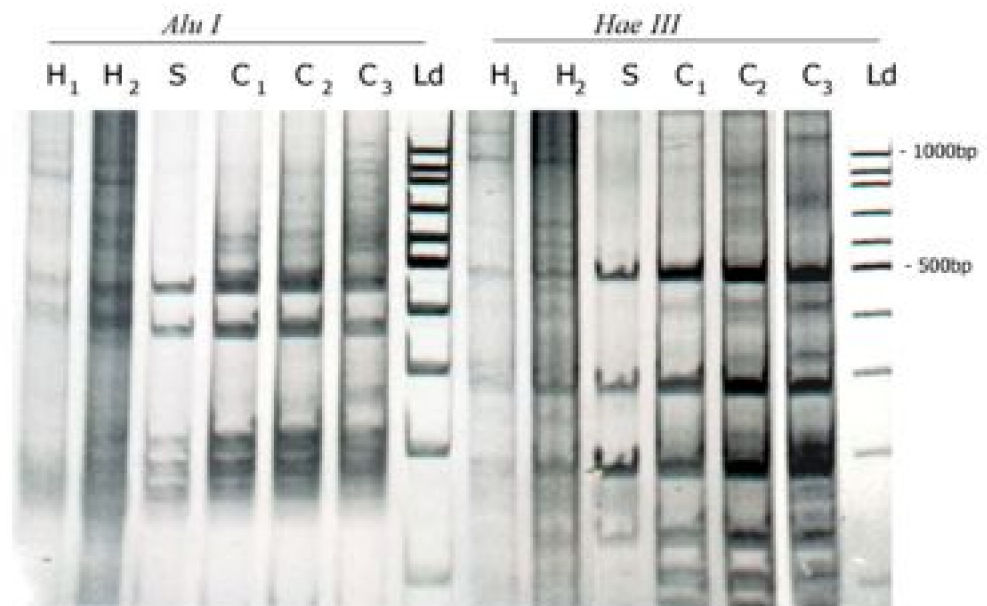


Figura 17. RFLP de genes 16S rDNA amplicados a partir del DNA extraído de: homogenizados de ostras descompuestas (H1, H2), fracciones cultivables de homogenizados de ostras descompuestas (C1, C2, C3), y de aislado 400bp31 (S). Ld: 100

bp marcador peso molecular.

4. Polimorfismo del gen 16S rDNA observado por formación de heterodupletes en productos de amplificación en cepas del género *Vibrio*.

4.1. Polimorfismo en cepas tipo del género *Vibrio*.

Una porción de esta parte del trabajo es común con la tesis de C. Moreno y corresponde a su trabajo inicial. Aquí se profundiza en experimentos con mayor participación del suscrito.

Desde el inicio del trabajo con bacterias del género *Vibrio* se observó la aparente paradoja: la amplificación del 16S rDNA bacteriano con los partidores Eubac27F y 1492R debiera generar un producto de aproximadamente 1.500 pb. Usando como templado una única colonia para la amplificación por PCR de los 16S rDNA de las cepas *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, se obtuvieron, sin embargo, además del producto de 1500 pb, otros productos con migración más lenta en la electroforesis en acrilamida (Figura 18.a). De acuerdo a lo descrito anteriormente (Espejo y cols., 1998), estas bandas podrían corresponder a heterodupletes formados entre amplificados de 16S rDNA de hebra simple que difieren levemente en la secuencia nucleotídica. La naturaleza de heterodupletes de estos productos puede demostrarse sometiendo a un ciclo adicional de amplificación, después de diluir 1:10 el amplificado. Esta dilución reduce la rapidez de renaturación en 100 veces y disminuyendo los heterodupletes a cantidades no detectables (Delwart y cols., 1993). Sin embargo, la presencia de las secuencias diferentes generalmente, puede ser revelada por la reaparición de los heterodupletes, al denaturar y renaturar estos últimos productos (Espejo y cols., 1998). La Figura 18.b muestra los resultados obtenidos al aplicar este procedimiento a los amplificados heterogéneos del 16S rDNA de *V. parahaemolyticus*. Los mismos resultados se obtuvieron con los productos de amplificación de *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* (no mostrado).

Resultados previos muestran que existe una cierta proporcionalidad entre el grado de disimilitud en las secuencias y el retardo observado en la migración electroforética de los heterodupletes (Espejo y cols., 1998). Lo mismo puede observarse al comparar especies dentro del género *Vibrio*, pero adicionalmente se observan las bandas de heterodupletes generadas por las diferencias intragenómicas (Figura 19). Según esta evidencia, las diferencias intragenómicas

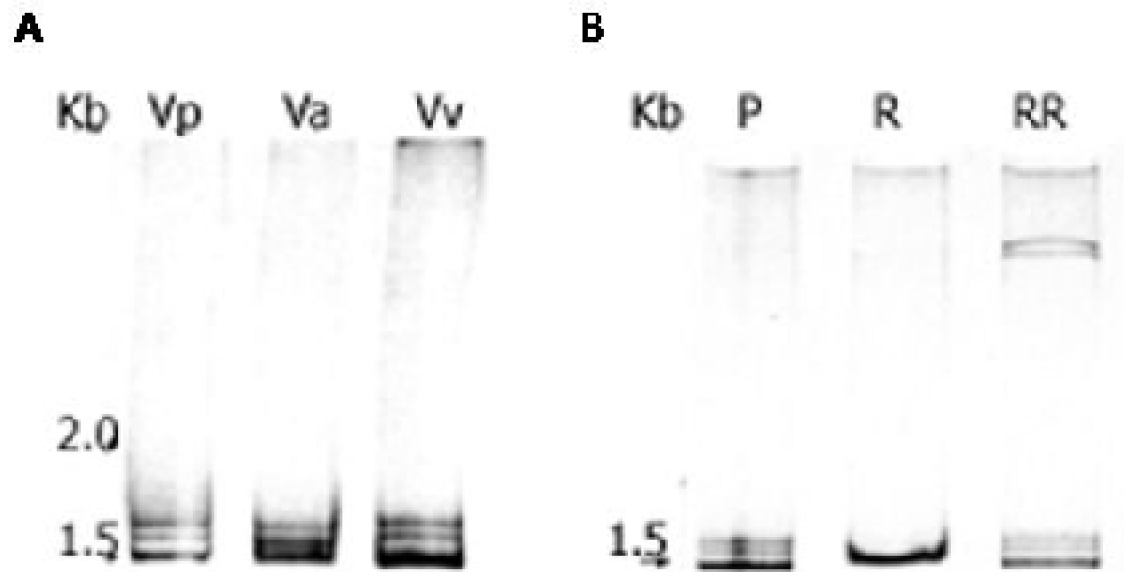


Figura 18. Visualización de Heterodupletes luego de la amplificación por PCR. (A) Productos de amplificación del 16S rDNA de cepas tipos de vibrios, empleando colonias como fuente de DNA templado (Vp :*Vibrio parahaemolyticus*, Va: *V. alginolyticus*, Vv: *V. vulnificus*). (B) Las bandas observadas en P, desaparecen por dilución y ciclo extra de amplificación (R); y reaparecen durante la renaturación de este último producto.

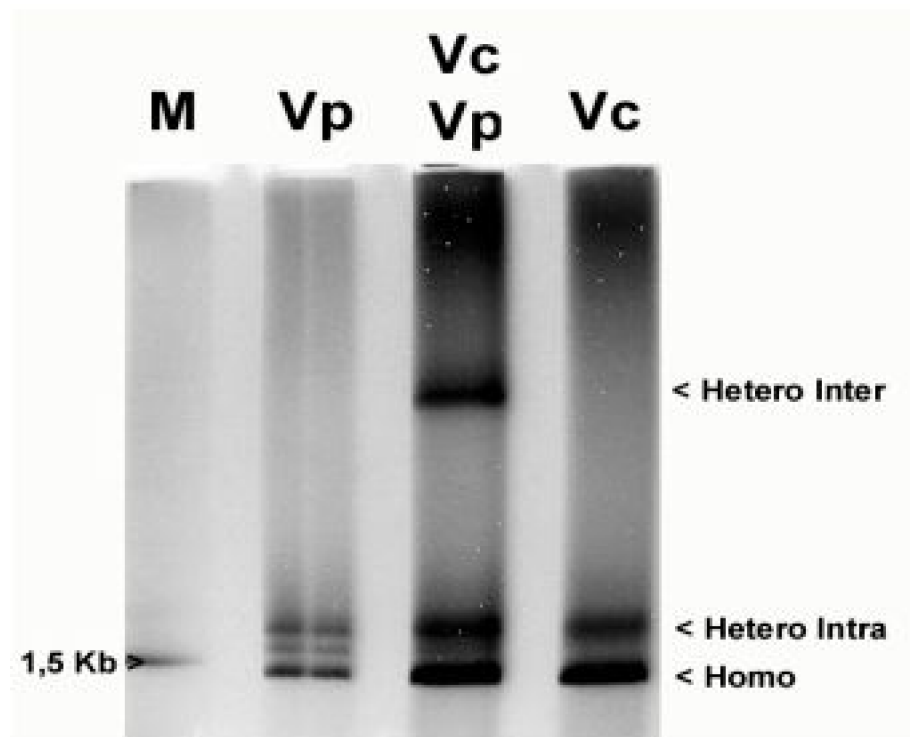


Figura 19. Diferencia en la migración relativa de los heterodupletes respecto a los homodupletes. Heterodupletes formados entre los 16SrDNA de las especies más distantes

del género *Vibrio* (*Hetero Inter*), es decir, entre *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) y *V. choleraea* (Vc), con 7% de diferencia en secuencia. Se muestran también las posiciones de los heterodupletes intragenómicos (*Hetero Intra*). Los 16S rDNA amplificados desde colonias, fueron mezclados en cantidades iguales y renaturados.

observadas en las secuencias de las cepas polimórficas podría estimarse cuantitativamente. El cálculo puede hacerse considerando únicamente cepas tipo del género *Vibrio* y comparando la migración relativa de los heterodupletes (Rf) con las diferencias en las secuencias reportadas para estas cepas (Tabla 2). De esta forma, la relación matemática para estimar la diferencia en secuencia (%) queda como:

$$\% \text{ diferencia} = -12,96 \times \text{migración relativa} + 13,03.$$

Usando esta ecuación la diferencia intragenómica observada en las cepas tipo de *Vibrio* (Figura 20) puede estimarse entre un 0,6 y un 1,1%.

Para comprobar la existencia real de estas diferentes copias de los genes 16S rDNA, los diferentes genes de *V. parahaemolyticus* fueron clonados; los clones fueron seleccionados en base a la capacidad del gen clonado para formar heterodupletes con los 16S portados por otros clones, los clones seleccionados se denominaron Vp16, Vp23, Vp27, F44. Los clones fueron secuenciados completamente y las secuencias depositadas en Genbank AF388387, AF388386, AF388389, AF388388, respectivamente. Tras la comparación de las secuencias de estas 4 copias de genes 16S rDNA de *V. parahaemolyticus*, se comprobó la existencia de secuencias que diferían en 0,3 y 1,1%.

4.2. Polimorfismo en *Vibrios* aislados de ostras

Algunas de las bacterias aisladas desde ostras se examinaron sometiendo a HMA los amplificados de sus 16S rDNA con el fin de estimar su relación con cepas del género *Vibrio*. Esto se realizó determinando la migración de los heterodupletes formados entre los 16S rDNA de cada cepa con el 16S de *V. parahaemolyticus* o *V. cholerae*. Las cepas analizadas correspondieron a cepas de los grupos A, B y C descritos en el Sección 2. De ellas sólo el grupo C resultó relacionado con *Vibrio* y todas las cepas de este grupo mostraron una identidad estimada de entre 96 y 97% con el 16S rDNA de *V. parahaemolyticus* y de 94% con el mismo gen de *V. cholerae* (Figura 21). Las cepas seleccionadas con este criterio se sometieron a la amplificación de su 16S rDNA y se examinó la formación de heterodupletes en los productos de

Tabla 2. Diferencias en las secuencias del gen 16S rDNA entre diferentes especies de *Vibrio*, calculada a través de la comparación de las secuencias reportadas para las cepas tipo de *Vibrio* (Nº acceso: Vp X74720; Va X74690; Vv X76333; Vc X74694).

% Diferencia en secuencia de 16S rDNA			
	Va	Vv	Vc
Vp	2	3	7
Va		3	7
Vv			6

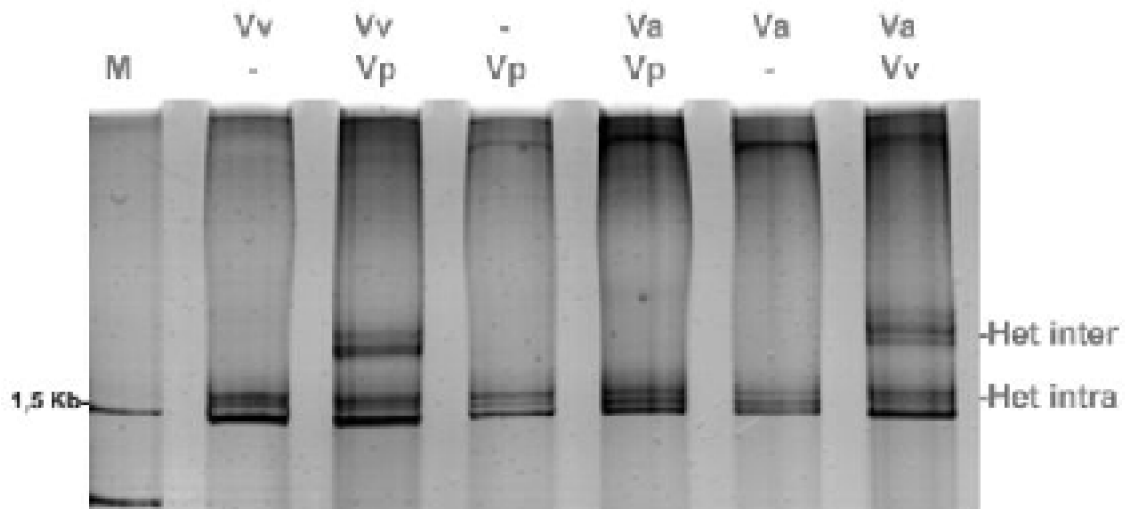


Figura 20. Heterodupletes formados entre los 16SrDNA de especies del género *Vibrio* (Het Inter), *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), *V. vulnificus* (Vv), *V. alginolyticus* (Va). Se muestran también las posiciones de los heterodupletes intragenómicos (Het Intra). Los 16S rDNA amplificados desde colonias, fueron mezclados en cantidades iguales y renaturados. Las especies con mayor diferencia presentan un retardo mayor (carriles Vv/Vp y Va/Vv).

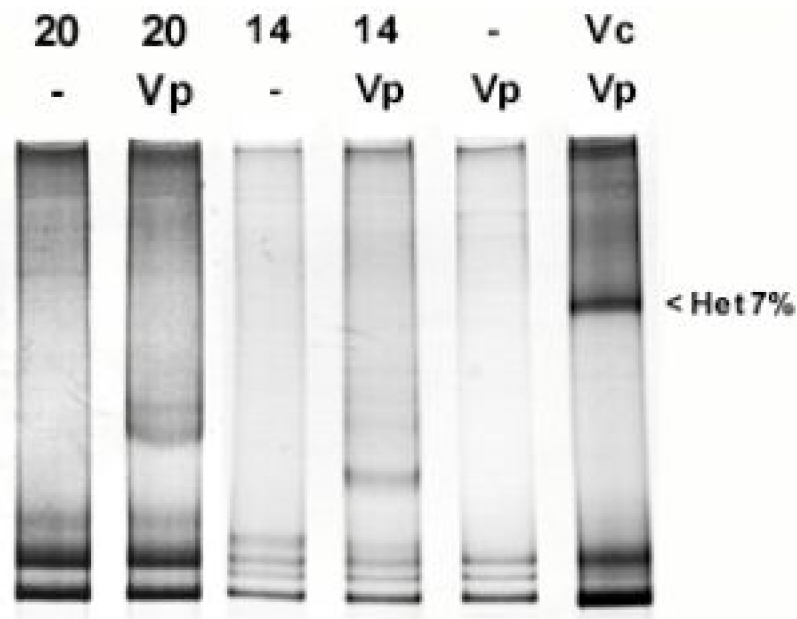


Figura 21. Ensayo de movilidad del heterodupletes con *Vibrios* y aislados del Grupo C. La migración de los heterodupletes de 16S formados entre los aislados y *V. parahaemolyticus* muestran menor retardo que el heteroduplet entre *V. parahaemolyticus* y *V. choleraea*, cuya diferencia en secuencia es del 7% (señalada por < Het 7%).

esta amplificación. La presencia de heterodupletes se consideró como una indicación de la existencia de polimorfismo. Los productos de amplificación de todas las cepas

mostraron la presencia de al menos dos bandas adicionales que migraban por sobre la banda del 16S rDNA amplificado, y que correspondían a heterodupletes. Al igual que en las cepas tipo de vibrio, la naturaleza de heterodupletes de estas bandas fue verificada por un ciclo extra de amplificación después de diluir y por renaturación de este producto. Algunas de esas cepas mostraron heterodupletes con una migración más lenta que los observados en *V. parahaemolyticus*, sugiriendo un polimorfismo mayor que el observado en esta cepa de colección. Aplicando la misma metodología que con las cepas tipo, la diferencia intragenómica en sus genes 16S rDNA se estimó en 2% (Figura. 20)

DISCUSIÓN

Esta tesis fue desarrollada convencido de que un mayor conocimiento de la ecología bacteriana en las ostras contribuiría al entendimiento del rol de la microflora de este organismo en procesos como la digestión y el metabolismo y la protección contra patógenos. Este conocimiento podría ser aplicado por los productores con el objetivo de mejorar la productividad y calidad sanitaria de las ostras.

Tamaño de la microflora.

Un primer paso en los estudios de ecología microbiana es conocer el tamaño y la composición de la comunidad presente, en cuanto a la riqueza y abundancia de sus componentes. Los resultados muestran que las bacterias obtenidas por cultivo *in vitro* representan una fracción menor (< 0,01%) del total de bacterias presentes en las ostras determinadas por microscopía de epifluorescencia. Esta recuperación es baja y se asemeja a la descrita para otros ambientes marinos (Amman y cols., 1995; Schmidt y cols., 1991). La razón para esta baja recuperación se desconoce. Una posible explicación consiste en que parte del total de las bacterias observadas con naranja de acridina correspondiese a microorganismos inactivados por el proceso de digestión de las ostras. Sin embargo, esta explicación fue descartada porque cuando se agregó *Vibrio alginolyticus* a la ostra como patrón externo, la inactivación fue mínima, con una

recuperación superior al 90%. Además, los recuentos usando Kist de viabilidad basados en la integridad de la membrana celular (Live/Dead, Molecular Probe) indicaron que las bacterias “muertas” según este criterio alcanzaban sólo el 10%.

Estos resultados son similares a aquellos obtenidos en la microflora intestinal humana, una de las más estudiadas. En humanos la cantidad total de bacterias en el tracto gastrointestinal alcanza 10^{14} (Berg 1996; Franks y cols., 1998); si se considera un valor de 80 Kg como el peso total promedio de una persona, entonces existirían 10^9 bacterias por gramo de tejido total. Este valor es cercano al obtenido en ostras, si se toma en cuenta las diferentes cantidades relativas de tracto gastrointestinal.

Cambios en la carga bacteriana durante la depuración

La depuración es un método dirigido a reducir la cantidad de bacterias indicadoras de contaminación en ostras y en otros bivalvos (Richards 1991). Los resultados obtenidos muestran que la depuración efectuada conduce a una mínima reducción de la carga bacteriana en ostras. Considerando los valores de la liberación de bacterias ($G=10^6$ bacterias/min/ostra) y el número de bacterias por ostra (10^{11}) determinados por microscopía de epifluorescencia, puede inferirse que una prolongación de la depuración por más de 2 h no cambiaría significativamente el contenido total de bacterias en la ostra. Por otra parte, atendiendo que los valores de G calculados por cultivo (10^4 UFC por minuto por ostra) y que existen hasta 10^7 UFC por ostra no depurada, se estima que a estas velocidades, las UFC se reducirían a cero dentro de 15 a 20 h de depuración, si no hubiera proliferación durante este tiempo. En vista de que las UFC por ostra, sólo se redujeron débilmente entre las 2 y las 20 h de depuración, es probable que algunas bacterias cultivables sean capaces de reproducirse dentro de la ostra durante la depuración. Coincidentemente, otros reportes indican que es difícil alcanzar reducciones de la carga bacteriana por debajo de las 10^4 UFC por gramo después de la depuración (Son y Fleet 1980; Ledo y cols., 1983; Richards 1991). La velocidad de crecimiento de las bacterias en esta condición probablemente es influenciada por la temperatura y esto explicaría los mejores rendimientos obtenidos al depurar a baja temperatura.

Como se muestra en Tabla 1 se alcanzaron reducciones en la carga bacteriana cercanas al 50% en el número de UFC/g luego de 2 h de depuración. Sin embargo, los recuentos totales por microscopía de epifluorescencia tuvieron una disminución insignificante, menor del 1%. Este resultado indica que la mayor parte de las bacterias permanece dentro de la ostra y que aquella pequeña fracción liberada durante la depuración, corresponde principalmente a bacterias cultivables. Las bacterias liberadas se identificaron por la secuencia de su 16S rDNA como pertenecientes a los géneros *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*. El análisis de RFLP de estos 16S rDNA (Fig. 4) permitió identificar a estos géneros como las poblaciones más abundantes entre las bacterias excretadas por la ostra y retenidas en el filtro. Es importante señalar que ninguno de éstos corresponde al género encontrado como más abundantes en la comunidad no cultivable en agar marino (Ver Sección 2.3, Engberg y cols., 2000).

Consistente con esto, la observación de espaciadores muy diferentes entre bacterias excretadas y retenidas en la ostra (Fig. 3), sugirió que la depuración era selectiva.

Bacterias cultivables

Los resultados presentados coinciden con los reportes que señalan que cerca de un 30% de las bacterias más frecuentemente aisladas desde las ostras corresponden a los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (Colwell y Liston 1960; Murchelano y Brown 1968; Kueh y Chan 1985). Atendiendo a las limitaciones de los estudios a través de medios de cultivo, los resultados entregaron interesante información de los rasgos genéticos de los aislados. El hecho de que la mayoría de las bacterias cultivadas pudieron ser separadas en sólo 3 grupos, de acuerdo a su patrón de espaciadores ribosomales, la alta identidad de las secuencias de 16S rDNA dentro de cada grupo, y la diferencias entre grupos, sugiere que el patrón de espaciadores puede ser una herramienta útil para distinguir especies dentro del ecosistema de la ostra. Las cepas en el grupo C mostraron la mayor heterogeneidad en el patrón de espaciadores y más de una banda, tras la amplificación de su 16S rDNA. El polimorfismo del gen 16S rDNA en estas cepas es discutido más adelante.

Por otra parte, la ausencia de vibrios cultivables a 37°C, podría deberse a que las temperaturas del agua costera oscilan entre los 12 y 14°C y se ha reportado que la presencia de vibrios cultivables disminuye fuertemente a bajas temperaturas (Kaspar y Tamplin 1993; Motes y cols., 1998). Sin embargo, no se puede descartar la presencia vibrios en estados viables no cultivables, como ha sido descrito en algunas especies como *Vibrio vulnificus* (Oliver, 1995).

Comparación de la fracción cultivable y la comunidad total

Considerando que las bacterias cultivadas corresponden a una pequeña fracción del total de bacterias presentes, no resultó sorprendente la notable diferencia observada entre el patrón de espaciadores del total de bacterias extraídas de la ostra y aquel de las bacterias cultivables. Estas diferencias sugieren que los grupos de microorganismos observados tras cultivo en agar marino, no representan bacterias prevalentes en las ostras (Fig. 7). Estas bacterias cultivables representan no sólo una pequeña fracción del total numérico, sino también de la diversidad de microorganismos presentes en las ostras.

Bacterias no cultivables

Los patrones de espaciadores obtenidos desde ostras individuales indica la presencia de una comunidad compleja y diversa de microorganismos en cada individuo (Fig. 8). Sin embargo, se observaron espaciadores comunes presentes en la mayoría de las ostras (1.000, 550 y 450 pb) que podrían corresponder a cepas bacterianas que constituyen parte de la microflora normal de la ostra y como tales, estarían presentes en la mayoría de los individuos (Savage 1977; Berg 1996). La observación de un espaciador muy intenso de 1.000 pb, en "pooles" de ostras cosechadas en diferentes épocas del año y en puntos muy distantes de la costa chilena, parece sustentar la hipótesis de que este espaciador abundante y común correspondería a una bacteria importante en la microflora de la ostra. El análisis de RFLP de los 16S rDNA también indicó la presencia de algunas especies comunes y abundantes en ostras. No obstante, los géneros encontrados como los más abundantes por ambos métodos fueron diferentes; el 16S rDNA correspondiente al patrón de RFLP predominante perteneció al género *Arcobacter*, mientras el espaciador predominante estaba asociado (contiguo) a un 16S rDNA que correspondió al género *Staphylococcus*. Esta discrepancia se debe probablemente a una diferencia en la eficiencia de amplificación de cada pareja de partidores. Se ha reportado que la amplificación de la misma muestra puede producir diferentes cantidades relativas de 16S rDNA cuando se realiza con diferentes parejas de partidores (Teske y cols., 1996; Schmalenberger y cols., 2001). En vista de que la eficiencia de amplificación está relacionada con la eficiencia en el alineamiento de los partidores, se analizaron las secuencias blanco en los diferentes géneros, en el sitio Ribosomal Data Project II (Maidak y cols., 2001). Estos análisis indicaron que la secuencia blanco para el partidador L1 (reverso en la amplificación del espaciador que hibrida cerca del extremo 5' del 23S rDNA) carece de complementariedad en *Campylobacter jejuni*, especie relacionada con *Arcobacter* spp. (Parkhill y cols., 2000; O'Sullivan y cols., 2000). Las secuencias de esta región en *Arcobacter* spp. no están disponibles. En concordancia con los resultados, las secuencias blanco para L1 sí están presentes en *Staphylococcus* spp. Los datos obtenidos sugieren que bacterias del género *Arcobacter* son abundantes en ostras y que el defecto en la observación de su espaciador contiguo, se debe a la ausencia de una secuencia blanco complementaria adecuada para la amplificación realizada.

Arcobacter spp. ha sido reportado en una variedad de habitats. Originalmente, bacterias de este género fueron conocidos como potenciales patógenos aislados desde heces de humanos y ganado (Vandamme y cols., 1992). Recientemente se han aislado un gran número de cepas, incluyendo quimioorganotrofos, desde aguas costeras y sedimentos marinos (McClung y Patriquin 1980; McClung y cols., 1983; Llobet-Brossa y cols., 1998; Thamdrup y cols., 2000; Houf y cols., 2001). Las bacterias relacionadas con *Arcobacter* pueden ser un componente común de la microflora de la ostra, particularmente de la porción anóxica del tracto gastrointestinal, dado que se han descrito bacterias de este género como preferentemente microaerófilas (Engberg y cols., 2000).

Participación de la microflora en la descomposición

Los resultados sugieren que las bacterias portadoras de un espaciador ribosomal de 400 pb son abundantes y comunes en ostras descompuestas. Aparentemente, este microorganismo está presente en las ostras desde el momento de la cosecha porque se observó un espaciador de 400 pb en el patrón de ostras frescas fracción cultivable (Figuras 14.B y 15). Probablemente, estas bacterias no son muy abundantes en las ostras antes de la cosecha, es decir, no representarían una porción importante dentro de la microflora, dado que no se observa una banda importante de 400 pb en el patrón de espaciadores del total de bacterias a las 4 y 25 h postcosecha, (Figura 14.A). Conforme progresó el tiempo postcosecha, se observó un aumento en la cantidad relativa del espaciador de 400 pb en las fracciones cultivables, lo cual sugiere que durante el almacenamiento y descomposición, ocurrió un enriquecimiento selectivo en bacterias portadoras de dicho espaciador (Figura 14.B y 15). Los análisis de restricción de estos espaciadores de 400 pb obtenidos de ostras descompuestas (fracción cultivable y total) permitieron identificar bacterias aisladas con este espaciador y posteriormente caracterizarlas y confirmar su abundancia en ostras descompuestas (Figura 16).

El análisis de la comunidad bacteriana presente en ostras descompuestas a través del patrón de restricción de los genes 16S rDNA y su comparación con el patrón generado a partir del 16SrDNA del aislado 400bp31 (Figura 17), mostró que los fragmentos de restricción generados por este aislado correspondieron con aquellos observados con mayor intensidad en el patrón de restricción obtenido sobre los amplificadores de ostras descompuestas, tanto de la fracción cultivable como del total. Esta observación confirmó que el aislado 400bp31 representó una de las cepas bacterianas más abundantes en ostras descompuestas y sugiere que la pérdida de las propiedades organolépticas están relacionadas con el crecimiento de esta cepa. Sin embargo, con las experiencias realizadas no se puede definir si el inicio de la descomposición coincide con el aumento de estas cepas en las ostras.

La secuenciación del 16S rDNA del aislado 400bp31 demostró que esta cepa pertenece al género *Pseudoalteromonas*. Este género corresponde a bacterias cultivables que son abundantes en agua de mar (Bowman y cols., 1997; Eilers y cols., 2000; Wirsen y cols., 2002). Entre ellas se encuentra *Pseudoalteromonas espejiana* aislada en 1968 frente a Montemar (Espejo y Canelo 1968). La caracterización fenotípica de estas bacterias por métodos convencionales (Smibert y Krieg 1994) mostró que esta cepa posee las propiedades generales descritas para este género (Gauthier y cols., 1995), como son la producción de exoenzimas catabólicas y el requerimiento de sales para su crecimiento. Es necesario mencionar que si el crecimiento en ostras (u otros bivalvos) es una propiedad general de este género bacteriano, entonces su abundancia en agua de mar podría deberse a la continua excreción de estas bacterias por parte de los bivalvos, hospederos donde estas bacterias crecerían a una tasa mayor que en forma plactónica.

Polimorfismo del gen 16S rDNA observado por

formación de heterodupletes en productos de amplificación en cepas del género *Vibrio*.

La observación de más de una banda en los amplificadores de 16S rDNA en las cepas tipo de *Vibrio*, sugirió la existencia de polimorfismo en los genes 16S rDNA de estas cepas. Como se demostró (Fig. 18) estas bandas corresponden a heterodupletes formados entre amplificadores de 16S rDNA de hebra simple que difieren en secuencia nucleotídica. Estos heterodupletes se forman en el último ciclo de la amplificación después de la etapa de denaturación y su formación depende de la concentración que alcancen estos productos de DNA simple hebra; cuando es alta el alineamiento entre estas cadenas levemente diferentes, compite con el alineamiento con los partidores.

La detección de heterodupletes en los amplificadores de DNA obtenidos de una única colonia probó ser un confiable indicador de la presencia de polimorfismo en el gen 16SrDNA. Este método permitió en primer término, revisar una gran cantidad de cepas del género *Vibrio*, tanto cepas tipo de colección como aisladas desde ostras; en segundo lugar mostrar que el polimorfismo intragenómico en el gen 16S rDNA es un fenómeno común en especies pertenecientes a este género, encontrándose en todas las cepas analizadas. Esto podría estar relacionado con el gran número de operones ribosomales que se encuentran comúnmente en *Vibrios*, generalmente cercano a 8 a 10 copias. Adicionalmente, la migración relativa de los heterodupletes en geles de poliacrilamida, permitió estimar la heterogeneidad intragenómica de las secuencias (Fig. 19). En el caso de *V. parahaemolyticus* esta estimación fue confirmada por la secuenciación de los diferentes 16S rDNA presentes en la cepa tipo ATCC 17802. En el caso de las cepas del Grupo C (Sección 2), la intraheterogeneidad resultó mayor que en las cepas tipo.

Estos resultados se agregan a los reportes que señalan la heterogeneidad intracelular en 16S rDNA en otros organismos (Ueda y cols., 1999). Es concebible que el poseer 16S rDNA polimórficos pueda constituir una ventaja selectiva para las bacterias. Por ejemplo, es posible que los ribosomas con moléculas de 16S rRNA diferentes, posean distintas respuestas ante la presencia de compuestos que interactúan con los ribosomas, como algunos antibióticos (Hu y Ochi 2001; Recht y cols., 1999). Esta heterogeneidad intragenómica debe tenerse en cuenta en los estudios de comunidades bacterianas a través de métodos moleculares, pues la existencia de varios operones ribosomales levemente diferentes en una misma bacteria, puede provocar una distorsión en cuanto a la diversidad de los componentes de dicha comunidad.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este estudio han permitido delinear las siguientes conclusiones:

- El tamaño de la comunidad bacteriana que constituye la microflora total en la ostra alcanza niveles de 10^{10} bacterias/g. La fracción cultivable sólo representa alrededor del 0,1% del total de las bacterias.
- Dentro de la fracción cultivable las poblaciones más abundantes correspondieron a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*.
- Existen poblaciones bacterianas más abundantes y comunes en la ostra chilena (*Tiostrea chilensis*), que probablemente forman la microflora normal. Éstas pueden distinguirse a través de métodos moleculares, como el patrón de espaciadores ribosomales y el RFLP de 16S rDNA. No obstante, ninguno de estos patrones fue observado entre las bacterias cultivables.
- El clonamiento y secuenciación de los 16S rDNA que presentaban el patrón de RFLP más abundante, indicó que este correspondería a bacterias del género *Arcobacter*.
- Durante la descomposición de las ostras, se produjo el aumento de una población bacteriana particular dentro de la ostra, que por secuencia de 16S rDNA correspondió a *Pseudoalteromonas* spp.
- Después de la depuración, la mayoría de las bacterias permanecen en las ostras. La pequeña fracción liberada corresponde a un grupo selecto de cepas, que consiste

principalmente de heterótrofos capaces de crecer en agar marino.

- El análisis de los 16S rDNAs amplificados de cepas vibrios de colección, reveló la existencia de heterogeneidad intragenómica (polimorfismo). Lo mismo ocurrió en todas las cepas del género *Vibrio* aisladas desde ostras chilenas.
- Las diferencias en secuencia de los 16S rDNA intragenómica alcanzó el 2% y se concentró en regiones del 16S reconocidas como variables. Este polimorfismo podría ser el resultado de un proceso de selección o de una transferencia lateral de genes.

BIBLIOGRAFÍA

- Amann R, Ludwig W, Scheifer K. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59:143-169.
- Berg RD. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4:430-435
- Bowman JP, McCammon SA, Brown MV, Nichols DS, McMeekin TA. 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic Sea ice. *Appl Environ Microbiol.* 63:3068-3078.
- Collins C, Lyne P, Grange J. 1991. *Vibrios, Aeromonas and Plesiomonas*. In: Collins C, Lyne P, Grange J, editors. *Microbiological Methods*. 6th ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, United Kingdom. p 250-258.
- Colwell R, Liston J.. 1960. Bacteriological study of the natural flora of the Pacific Oysters, (*Crassostrea gigas*). *Appl Microbiol.* 8:104-109.
- Cook DW. 1991. Microbiology of Bivalve Molluscan Shellfish. pp. 19-39. In: Ward R. and C. Hackney (eds). *Microbiology of Foods Products*, Van Nostrand Reinhold, New York. U. S. A.
- Cook DW. 1994. Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in postharvest gulf coast shellstock oysters. *Appl Environ Microbiol.* 60:3483-3484.
- Delwart E L, Shpae EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, RübSamen-Waigman H, Mullins JI 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262: 1257-1261.

- De Paola A, Hopkins L, Peeler J, Wentz B, Mc Phearson R. 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2299-2302
- Dorsch M, Lane D, Stackebrandt E. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 42: 58-63.
- De Long EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5685-5689
- Eilers H, Pernthaler J, Glöckner FO, Amann R. 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol.* 66:3044-3051.
- Engberg J, Stephen LWO, Harrington CS, Gerner-Smidt P. 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *J Clin Microbiol* 38: 286-291.
- Espejo RT, Canelo ES. 1968. Properties and characterization of the host bacterium of bacteriophage PM2. *J Bacteriol.* 1968 95:1887-1891.
- Espejo RT, Feijóo CG, Romero J, Vásquez M. 1998. Page analysis of the heteroduplexes formed between PCR amplified 16S ribosomal RNA genes: Estimation of Sequence Similarity and rDNA complexity. *Microbiology* 144: 1611-1617.
- Espejo RT, Romero J. 1997. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from a commercial scale copper leaching plant. *Appl Environ Microbiol* 63:1344-1348
- Fegatella F, Lim J, Kjelleberg S, Cavicchioli R. 1998. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl Envir Microbiol* 64: 4433-4438.
- Food and Drug Administration. 1995. National Shellfish Sanitation Program Manual Of Operations. Part II. Washington, D.C. published by Program and Enforcement Branch Office of Seafood Center for Food Safety and Applied Nutrition U.S. Food and Drug Administration
- Fleet GH. 1978. Oyster depuration- a review. *Food Technol Aust* 30:444-454
- Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide Probes *Appl Environ Microbiol.* 64: 3336-3345
- Gauthier G, Gauthier M, Christen R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol.* 45:755-761.
- Gill CO. 1986. The control of microbial spoilage in fresh meats. In: Pearson AM, Dutson TR editors. *Advances in meat research: meat and poultry microbiology.* Macmillan TL, New York, N.Y. P 49-88

- Gray MW, Sankoff K, Cedergren RJ. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: A global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunits ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 12: 5837-5852.
- Grossart HP, Steward GF, Martínez J, Azam F. 2000. A simple, rapid method for demonstrating bacterial flagella. *Appl Environ Microbiol.* 66:3632-3636.
- Gurtler V, Stanisich V. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142:3-16.
- Hoff JC, Beck WJ, Ericksen TH, Vasconcelos GJ, Presnell NW. 1967a. Time-temperature effects on the bacteriological quality of stored shellfish. I. Bacteriological changes in live shellfish: pacific oysters (*Crassostrea gigas*), Olympia oysters (*Ostrea lurida*), native littleneck clams (*Protothaca staminea*), and manila clams (*Venerupis japonica*). *J Food Science* 32:121-124.
- Hoff JC, Beck WJ, Ericksen TH, Vasconcelos GJ, Presnell NW. 1967b. Time-temperature effects on the bacteriological quality of stored shellfish. II. Bacteriological changes in shucked pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and Olympia oysters (*Ostrea lurida*). *J Food Science* 32:125-129.
- Hu H, Ochi K. 2001. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol* 67: 1885-1892.
- Houf K, Devriese LA, De Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P. 2001. Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *Int J Food Microbiol* 71:189-196.
- Jackson TC, Acuff GR, Dickson JS. 1997. Meat, shellfish and seafood. In: Doyle MP, Beauchat LR, Montville TJ, editors. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Washington DC, ASM Press. P. 90
- Jensen, MA, Straus N. 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Appl.* 3:186-194.
- Johnson JL. 1994. Similarity analysis of rRNAs. In Gerhardt P, editor. *Methods For General And Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC, p 683-700
- Kaspar CW, Tamplin M. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 59:2425-2429
- Kirjavainen PV, Gibson G. 1999. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann Med.* 31:288-292
- Koutsoumanis K, Nychas JGE. 1999. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Appl Environ Microbiol.* 65: 698-706.
- Kueh C, Chan K. 1985. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oysters. *J Appl Bacteriol* 59: 41-47
- Lamfrom H, Sarabhai A, Abelson, J. 1978. Cloning of *Beneckea* genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 133: 354-363.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed)

- Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp 115-175
- Ledo A, González E, Barja JL, Toranzo A. 1983. Effect of depuration systems on the reductions of bacteriological indicators in cultured mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus). *J Shellfish Res* 3:59-64.
- Llobet-Brossa E, Rosselló-Mora R, Amann R. 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 64:2691-2696.
- Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT Jr, Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, Tiedje JM. 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29:173-174
- Margulis L., L. Nault, & J. Sieburth. 1991. *Critispira* from oyster styles: complex morphology of large symbiotic spirochetes. *Symbiosis*. 11:1-19.
- Marino A, Crisafi G, Maugeri TL, Nostro A, Alonzo V. 1999. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* non-O1, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* and *Vibrio harveyi* by mussels in seawater. *New Microbiol* 22:129-138
- McClung CR, Patriquin DG . 1980. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Can J Microbiol* 26:881-886.
- McClung CR, Patriquin DG, Davis RE. 1983. *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Int J Syst Bacteriol*. 33:605-612.
- Motes ML, De Paola A , Cook DW, Veazey JE, Hunsucker JC, Garthright WE, Blodgett RJ, Chirtel S. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol*. 64:1459-1465.
- Murchelano R, Brown C. 1968. Bacteriological study of the natural flora of the Eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *J Invert Pathol*. 11: 519-520.
- Murphree RL, Tamplin ML. 1995. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl Environ Microbiol* 61:3656-3660.
- Oliver JD. 1995. The viable but not culturable state in the human pathogen, *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett*. 133:203-208.
- O'Sullivan NA, Fallon R, Carroll C, Smith T, Maher M. 2000. Detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chicken samples using a PCR/DNA probe membrane based colorimetric detection assay. *Mol Cell Probes* 14:7-16.
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403:665-668.
- Paster B, Pelletier D, Dewhirst F, Weisburg W, Fusing V, Poulsen L, Dannenberg S, Schroeder I. 1996. Phylogenetic position of the spirochetal genus *Cristispira*. *Appl Environ Microbiol*. 62: 942-946.

- Pizarro J, Jedlicki E, Orellana O, Romero J, Espejo RT. 1996. Bacterial population in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl Environ Microbiol*. 62:1323-1328.
- Power UF, Collins JK. 1990. Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Appl Environ Microbiol* 56:803-807.
- Recht MI, Douthwaite S, Puglisi JD. 1999. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO Journal* 18: 3133-3138.
- Reischl U, Feldmann K, Naumann L, Gaugler BJ, Ninet B, Hirschel B. 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 36: 1761-1764.
- Richards GP. 1991. Shellfish Depuration. In: Ward R, Hackney C, editors. *Microbiology of Marine Foods Products*. New York: Van Nostrand Reinhold. p. 395-428.
- Rowse AJ, Fleet GH. 1984. Effects of water temperature and salinity on elimination of *Salmonella charity* and *Escherichia coli* from Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis*). *Appl Environ Microbiol* 48:1061-1063.
- Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Bousemart O, Gauthier M, Christen R. 1994. Phylogenetic analysis and assesment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*. 44: 416-426.
- Savage DC. 1997. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31:107-133
- Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe CC. 2001. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol* 67:3557-3563.
- Schmidt T, De Long E, Pace N. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequence. *J Bacteriol*. 173:4371-4378
- Smibert RM, Krieg NR. 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhart P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR editors. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. 1st ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. P 607-654
- Son NT, Fleet GH. 1980. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, re-laying and storage. *Appl Environ Microbiol* 40:994-1002.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J, Gibson GR, Collins MD, Doré J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 65: 4799-4807
- Tall BD, La Peyre F, Bier J, Miliotis M, Hanes D, Kothary M, Shah D, Faisal M. 1999. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Appl Environ Microbiol*. 65: 4261-4263
- Teske A, Sigalevich P, Cohen Y, Muyzer G. 1996. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* 62:4210-4215

- Thamdrup B, Rosselló-Mora R, Amann R. 2000. Microbial manganese and sulfate reduction in Black Sea shelf sediments. *Appl Environ Microbiol* 66:2888-2897.
- Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T, Kataoka M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol* 181: 78-82.
- Ulrich N, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann R, Ludwig W Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178: 5636-5643.
- Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, Van Den Borre C, Higgins R, Hommez J, Kersters K, Butzler J-P, Goossens H. 1992. Polyphasic taxonomic studies of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol* 42:344-356
- Vanderzant C, Thompson C. 1973. Microbial flora and level of *Vibrio parahaemolyticus* of oysters (*Crassostrea virginica*), water and sediment from Galveston Bay. *L. Milk Food Technol.* 36:443-452.
- Wang, Y, Zhang ZS, Ramanan, N. 1997. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *J Bacteriol* 179: 3270-3276.
- Wirsen CO, Sievert SM, Cavanaugh CM, Molyneuc SJ, Ahmad A, Taylor LT, DeLong EF, Taylor CD. 2002. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Appl Environ Microbiol* 68:316-325.
- Wolfe CJ, Haywood MG. 1993. Bioluminescent symbionts of the caribbean flashlight fish (*Kryptophanaron alfredi*) have a single rRNA operon. *Mol Mar Biol Biotechnol* 2:189-197.
- Wommack KE, Colwell RR. 2000. Viroplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 69-114.
- Wright AC, Hill RT, Johnson JA, Roghman MC, Colwell RR, Morris J Jr. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 62:717-24.
- Yamaichi Y, Iida, T, Park KS, Yamamoto K, Honda T. 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol* 31: 1513-1521.
- Yap, WH, Zhang Z, Wang, Y. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J Bacteriol* 181: 5201-5209.

ANEXOS

Anexo 1

Esquema del ensayo de movilidad del heteroduplete.

