CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 91

30 Octubre 2003

Por Ricardo Cedeño, M.Sc.
InvestigadorMicrobiología

"Caracterización de bacterias aisladas en larvas de *Penaeus vannamei* mediante RAPDs"

INTRODUCCION

La "*Vibriosis luminiscente*" reportada por varios laboratorios de larvas del Ecuador es asociada principalmente a la bacteria *Vibrio harveyi*. Los métodos de identificación bacteriana tradicionales se basan en la observación de características morfológicas y pruebas bioquímicas, sin embargo la identificación de especies bacterianas y en especial de Vibrios ambientales ha presentado ciertas dificultades debido al tiempo que demanda el proceso y a su gran diversidad. La técnica molecular conocida como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) permite realizar tareas como análisis de población, mapeo genético estudios filogenéticos e identificación bacteriana, por lo que ha sido utilizada para la identificación y clasificación de una gran variedad de especies bacterianas y cepas tales como *Vibrios* lo que demuestra su utilidad para ser empleada en la industria de la acuicultura. Esta técnica emplea un "primer" (secuencia de nucleótidos) que se une a cualquier región del genoma donde encuentre una secuencia complementaria, lo que resulta en una amplificación de esos fragmentos que pueden ser separados y visualizados posteriormente por medio de electroforesis en un gel de agarosa. El CENAIM condujo un estudio de evaluación de varios primers (RAPD) para la caracterización de cepas de *V. harveyi* aisladas de laboratorios de larvas e identificadas bioquímicamente como tales. Este estudio permitió además determinar la existencia de variabilidad intraespecífica o líneas clonales dentro de esta especie mediante el análisis de la diversidad genética entre aislados de *V. harveyi*.

METODOLOGIA

Se aislaron 40 cepas bacterianas de laboratorios de larvas entre 1998-2001. Para fines comparativos se incluyeron 11 cepas *V. harveyi* (identificadas bioquímicamente) aislados de cultivos de peces por la Universidad de Santiago de Compostela, España. Las cepas fueron analizadas *bioquímicamente* para su identificación con métodos convencionales en tubo y en placa. Se realizaron RAPDs (primers seleccionados previamente) a cepas de *V. harveyi* de diferentes hospedadores y orígenes geográficos (11 de origen español y 9 de origen ecuatoriano). Las imágenes de los geles (obtenidas con el RAPD) fueron analizados con el programa "Diversity Database Software" (Bio-Rad), la similaridad entre los aislados fue estimada empleando el coeficiente de Dice (S_d). Finalmente dendrogramas fueron elaborados en base al metodo conocido como UPGMA (Unweighted average pair group method).

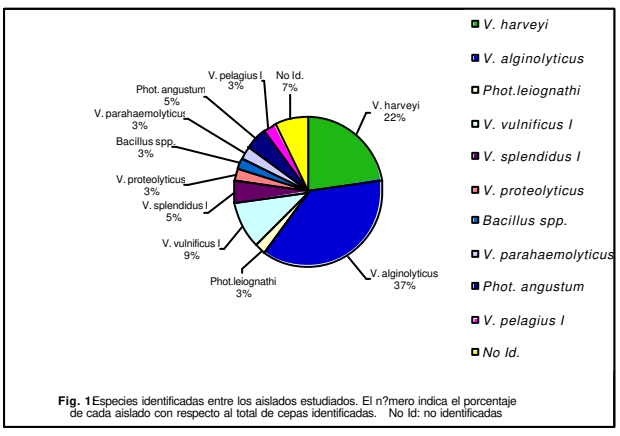

Fig. 1 Especies identificadas entre los aislados estudiados. El n?mero indica el porcentaje de cada aislado con respecto al total de cepas identificadas. No Id: no identificadas

RESULTADOS

Caracterización bioquímica: La caracterización de los aislados (40) nos permitió determinar la presencia de las siguientes especies bacterianas en larvas de camarón del Ecuador: *V. alginolyticus (15), Vibrio harveyi (9), V. vulnificus I(4), V. splendidus I(2)*, en menor número las especies tales como, *V. proteolyticus (1), V.parahaemolyticus(1), V. pelagius (1), Photobacterium angustum (2), Photobacterium leiognathi (1), Bacillus spp.(1)*, y un grupo de 3 bacterias que no pudieron ser identificadas satisfactoriamente (Fig.1).

Análisis de diversidad intraespecífica entre aislados *V. harveyi*: Las amplificaciones por RAPDs permitieron determinar la similaridad entre los aislados con un dendrograma.

Al realizar el análisis conjunto de las cepas de peces y camarones se observan dos grandes grupos (Fig.2), el primero "A" reúne a 5 aislados de los cuales 4 son de camarones y 1 de peces, un segundo grupo "B" abarca los restantes 15 aislados de donde 5 corresponden a camarones y 10 a peces. Los valores de similaridad entre estos grupos son muy bajos (inferiores a un 5%). En el grupo "A" se encuentran relacionados algunos aislados de camarón 158-Luma y 245-E22 con valores de similaridad de 22% y 57% respectivamente. En tanto el aislado proveniente de peces (PC523.1) no se agrupa con ninguno de los dos.

CONCLUSIONES

-Las pruebas bioquímicas permitieron identificar satisfactoriamente un alto porcentaje de los aislados estudiados (93%).

-El *V. harveyi* y el *V. alginolyticus* constituyen las especies dominantes (59% de las cepas) durante los episodios de mortalidad en cultivos larvarios del *P. vannamei.*

-Los aislados de *V. harveyi* (principales causantes de vibriosis luminiscente) presentan un alto grado de diversidad genética independientemente de su origen geográfico u hospedadores.

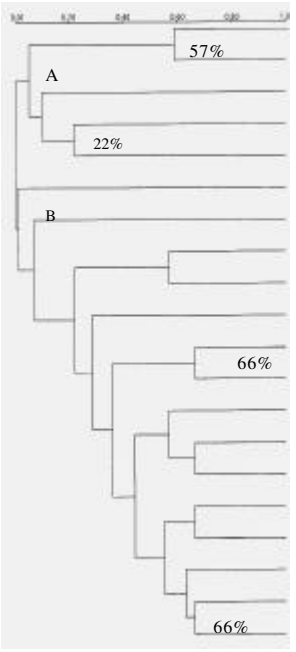

Fig. 2- Dendrograma establecido con el programa Diversity Database (Bio-Rad) usando el coeficiente de Dice y UPGMA sobre los perfiles RAPD obtenidos con el primer P5 para las cepas de *V. harveyi* provenientes de camarones y de peces. Pl: Postlarva, Zoea: ZoeaII.